

**EKSTRAK PROPOLIS SEBAGAI PREVENTIF INFEKSI
VIRUS ND (*Newcastle Disease*) SECARA *IN VITRO*
PADA KULTUR MAKROFAG BERDASARKAN
PENURUNAN *Interferon Alpha* (IFN- α)
DAN *Interleukin-17* (IL-17)**

SKRIPSI

Oleh :
DIDIK AFIF SUCITRA
125130106111004



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**EKSTRAK PROPOLIS SEBAGAI PREVENTIF INFEKSI
VIRUS ND (*Newcastle Disease*) SECARA *IN VITRO*
PADA KULTUR MAKROFAG BERDASARKAN
PENURUNAN *Interferon Alpha* (IFN- α)
DAN *Interleukin-17* (IL-17)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

EKSTRAK PROPOLIS SEBAGAI PREVENTIF INFEKSI VIRUS ND (*Newcastle Disease*) SECARA *IN VITRO* PADA KULTUR MAKROFAG BERDASARKAN PENURUNAN *Interferon Alpha* (IFN- α) DAN *Interleukin-17* (IL-17)

Oleh :

DIDIK AFIF SUCITRA
125130106111004

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 12 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof.Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS
NIP. 19480615 197702 001

drh. Dahliatul Qosimah, Mkes
NIP. 19820127 2015 04 2001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Didik Afif Sucitra

NIM : 125130106111004

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis skripsi berjudul :

Ekstrak Propolis Sebagai Preventif Infeksi Virus ND (*Newcastle disease*)
Secara *In Vitro* Pada Kultur Makrofag Berdasarkan Penurunan *Interferon*
alpha (IFN- α) dan *Interleukin-17* (IL-17)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaksud di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 12 Januari 2018

Yang menyatakan,

Didik Afif Sucitra

NIM. 125130106111004

**EKSTRAK PROPOLIS SEBAGAI PREVENTIF INFEKSI VIRUS ND
(Newcastle Disease) SECARA *IN VITRO* PADA KULTUR
MAKROFAG BERDASARKAN PENURUNAN
Interferon Alpha (IFN- α) DAN
*Interleukin-17 (IL-17)***

ABSTRAK

Newcastle Disease merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh strain virulen *Avian Paramyxoviridae*. Virus ND bersifat intraseluler, sehingga dapat memicu timbulnya respon imun seluler seperti aktivasi dari makrofag dan meningkatnya produksi sitokin. Oleh karena itu diperlukan antivirus dan imunostimulator sebagai upaya agar makrofag tidak terinfeksi virus. Propolis memiliki kandungan aktif yang dapat berperan sebagai antivirus dan imunostimulator. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak propolis untuk preventif infeksi ND pada kultur makrofag berdasarkan penurunan produksi sitokin proinflamasi. Penelitian ini bersifat ekperimental dengan metode *post test only control grup design* dengan menggunakan kultur makrofag yang didapat dari peritoneum mencit strain Balb/C jantan umur 6 minggu. Kultur makrofag tersebut dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (K-) kultur makrofag tanpa perlakuan, kontrol positif (K+) kultur makrofag tidak diberi ekstrak propolis tetapi diinduksi virus ND, selanjutnya P1,P2,P3 diberikan dengan dosis bertingkat 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar IFN- α dan IL-17. Masing-masing diukur dengan metode *flocytometry* setelah melewati masa inkubasi dan panen sel. Analisa data dilakukan menggunakan uji *Post Hoc Tukey*. Hasil dari penelitian ini IFN- α dan IL-17 konsentrasi ekstrak propolis 100 μ g/ml dapat digunakan untuk preventif infeksi virus ND ($p < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini pemberian ekstrak propolis dapat menurunkan produksi IFN- α dan IL-17.

Kata kunci : *Newcastle Disease*, Propolis, *Interferon Alpha*, *Interleukin-17*

**PROPOLIS EXTRACT FOR PREVENTIVE INFECTION VIRUS ND
(Newcastle Disease) DECREASE IN CULTURE BASED
MACROPHAGES *Alpha Interferon (IFN- α)*
AND *Interleukin-17 (IL-17)***

ABSTRACT

Newcastle Disease is a disease in poultry caused by the virulent strain Avian Paramyxoviridae. ND virus is intracellular, so it can lead to cellular immune responses such as activation of macrophages and increased production of cytokines. Therefore required antivirus and immunostimulator as an effort to prevent macrophages are not infections with the virus. Propolis has an active ingredient that can act as an antiviral and immunostimulator. The purpose of this research is to know the potency of propolis extract for preventive ND infection on macrophage culture based on decrease production of proinflammatory cytokines. This research was experimental with *post test only control group design* method using macrophage culture obtained from peritoneum of male Balb / C 6-week-old male. The macrophage culture was divided into 5 treatment groups is negative control (K-) of untreated macrophage culture, positive control (K +) macrophage culture was not given propolis extract but induced ND virus, P1, P2, P3 were then given with a dose of 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Parameters observed in this study were IFN- α and IL-17 levels. Each was measured by the *flocytometry* method after passing through the incubation period and harvesting the cells. Data analysis was performed using *Post Hoc Tukey test*. The results of this research IFN- α and IL-17 concentration extract of propolis 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ can be used to prevent virus infection ND ($p < 0,05$). The conclusion of this research giving propolis extract can decrease the production IFN- α and IL-17.

Keywords: *Newcastle Disease, Propolis, Interferon Alpha, Interleukin-17*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan nikmat, limpahan rahmat, serta hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul **“EKSTRAK PROPOLIS SEBAGAI PREVENTIF INFEKSI VIRUS ND (*Newcastle Disease*) SECARA *IN VITRO* PADA KULTUR MAKROFAG BERDASARKAN PENURUNAN *Interferon Alpha* (IFN- α) DAN *Interleukin-17* (IL-17)”**.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada segenap pihak, yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dan membimbing dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini. Secara khusus penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
2. Drh. Dyah Ayu Oktavanie A. P., M. Biotech selaku Wakil Dekan 1 Fakultas Kedokteran Hewan atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
3. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS selaku pembimbing I dan drh. Dahliatul Qosimah, Mkes. selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan serta nasehat kepada penulis.
4. drh. Indah Amalia A., M.Si selaku dosen penguji 1 dan drh. Ahmad Fauzi, M.Sc selaku dosen penguji 2 atas saran yang diberikan.
5. Ibu dan Bapak (Martini Alm dan Muhammad Nur Latief) dan kakak-kakak saya yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dukungan baik secara moril maupun

materil kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.

6. Teman-teman yang selama ini telah belajar bersama selama menjadi mahasiswa di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
7. Keluarga besar serta seluruh mahasiswa FKH UB yang telah menjadi kolega baru selama proses pendidikan di Kedokteran Hewan.
8. Serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, maka saran dan kritik yang konstruktif dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhirnya hanya kepada Allah SWT kita kembalikan semua urusan dan semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis dan para pembaca pada umumnya, semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan.

Malang, 12 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Batasan Masalah.....	3
1.4. Tujuan.....	4
1.5. Manfaat.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Newcastle Disease (ND)	5
2.1.1 Etiologi.....	5
2.1.2 Gejala Klinis.....	6
2.1.3 Patogenesitas	7
2.1.4 Cara penularan.....	10
2.1.5 Diagnosa.....	11
2.1.6 Imunitas terhadap virus	11
2.1.7 Pengendalian dan Pencegahan	13
2.2 Interferon- α	13
2.3 Interleukin-17 (IL-17)	15
2.4 Makrofag	16
2.5 Propolis.....	17
2.5.1 Karakteristik propolis	19
2.5.4 Kandungan Propolis	19
2.5.4 Jenis-jenis Propolis	20
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka konsep	22
3.2 Hipotesis penelitian	25
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	26
4.2 Alat dan bahan	
4.2.1 Alat penelitian	26
4.2.2 Bahan penelitian	27
4.3 Tahapan Penelitian	28
4.4 Langkah Kerja	
4.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	28

4.4.2	Rancangan penelitian	29
4.4.3	Variabel Penelitian	30
4.4.4	Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis	31
4.4.5	Penentuan Dosis Ekstrak Propolis.....	32
4.4.6	Pembuatan Kultur Makrofag	33
4.4.6.1	Isolasi Makrofag	33
4.4.6.3	Kultur Makrofag	34
4.4.7	Pemberian Ekstrak Propolis pada Kultur Makrofag.....	35
4.4.8	Preparasi Virus ND	35
4.4.8.1	Membiakkan Virus ND Pada Telur Ayam Berembrio	35
4.4.8.2	Hemagglutination (HA) Test.....	35
4.4.8.3	Pemberian Virus ND pada Kultur Makrofag	36
4.4.9	Penentuan Produksi IFN- α dengan <i>Flowcytometry</i>	36
4.4.10	Penentuan Produksi IL-17 dengan <i>Flowcytometry</i>	37
4.5	Analisis Data	38
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN		
5.1	Ekstrak Propolis untuk preventif infeksi Virus ND (<i>Newcastle disease</i>) secara <i>in vitro</i> pada kultur Makrofag berdasarkan penurunan IFN- α (<i>Interferon alpha</i>) dan IL-17 (<i>Interleukin-17</i>).....	39
5.2	Pengujian pengaruh ekstrak propolis terhadap kadar IFN- α dengan uji kruskal-wallis	43
5.3	Pengujian pengaruh ekstrak propolis terhadap kadar IL-17 dengan uji kruskal-wallis	48
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN		
6.1	Kesimpulan.....	54
6.2	Saran	54
DAFTAR PUSTAKA		55
LAMPIRAN.....		60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Tabel Aktivitas IFN- α	45
5.2 Tabel Aktivitas IL-17	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Virus <i>Newcastle Disease</i>	6
2.2 Lebah Penghasil Propolis	18
5.1 Gambaran Kultur Makrofag	40
5.2 Gambar Kultur Makrofag Yang Diberi Ekstrak Propolis Diinkubasi Selama 24 jam	41
5.3 Histogram Rata-rata Kadar IFN- α	44
5.4 Histogram Rata-rata Kadar IL-17	49



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol / Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ND	<i>Newcastle Disease</i>
APMV-1	<i>Paramyxovirus type-1</i>
APMV-10	<i>Paramyxovirus type-10</i>
RNA	<i>Ribose nucleic acid</i>
NM	<i>Nanometer</i>
IFN- α	<i>Interferon alpha</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IL 17	<i>Interleukin 17</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
PUSVETMA	<i>Pusat Veterinaria Farma</i>
g	<i>Gram</i>
VVND	<i>Velogenik viscerotropik Newcastle disease</i>
HN	<i>Hemagglutinin-neuraminidase</i>
PROTEIN F	<i>Protein Fusion</i>
pH	<i>Potensial Hidrogen</i>
V4	<i>Strain vaksin ND</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
RA	<i>Rheumatoid Arthritis</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
Th-2	<i>T helper</i>
G-CFS	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CFS	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
CXCL1	<i>Chemokine Ligand 1</i>
CCL2	<i>C-C motif ligand 2</i>
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase-1</i>
RES	<i>Retikulo Endotelial System</i>
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor β</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
cc	<i>centimeter cubic</i>
CO ₂	<i>Karbondioksida</i>
ml	<i>Milliliter</i>
PBS	<i>Phospat Buffer Saline</i>
PAP	<i>Pakan Alternatif Pelet</i>
pH	<i>Power of Hydrogen</i>

RAL	<i>Rancangan Acak Lengkap</i>
µg/ml	<i>Mikrogram per mililiter</i>
TB	<i>Tubercle bacillus</i>
TAB	<i>Telur Ayam Berembrio</i>
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
HA	<i>Hemagglutination</i>
CD68	<i>Cluster of Differentiation 68</i>
RPM	<i>Revolutions Per Minute</i>
TRL	<i>Toll-Like Receptor</i>
RES	<i>Retikulo Endotelial System</i>
DMSO	<u><i>Dimetil sulfoksida</i></u>
GF	<i>growth factor</i>
TB	<i>Trypan Blue</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit *Newcastle Disease* (ND) merupakan penyakit mematikan yang menyerang unggas, yang penyebarannya meliputi seluruh wilayah di dunia terutama di Asia Tenggara. *Newcastle Disease* pertama kali ditemukan oleh Doyle di daerah Newcastle Inggris pada tahun 1926. Di Indonesia, penyakit ini merupakan penyakit infeksius penting dalam industri perunggasan karena dapat menimbulkan kerugian berupa kematian ayam, penurunan produksi telur pada ayam petelur, gangguan pertumbuhan, dan penurunan berat badan pada ayam pedaging (DEPTAN 2006). Penyakit ini menyerang semua jenis unggas, baik yang liar ataupun yang telah dibudidayakan. *Newcastle disease* merupakan suatu penyakit pernafasan yang bersifat sistemik, akut, dan epidemik disebabkan oleh virus golongan *paramyxovirus*. Famili ini tergolong ke dalam virus RNA yang memiliki selubung luar (envelope) dan sel target berupa sel epitel mukosa saluran pernafasan dan pencernaan.

Penyakit ND disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus type-1* (APMV-1), genus *Avulavirus*, famili *Paramyxoviridae*. *Avian Paramyxovirus* terdiri dari sembilan serotype yakni APMV-1 sampai APMV-10 (OIE, 2012). Virus ND termasuk kelompok virus RNA dengan genom berserat tunggal (single stranded/ss) dan berpolaritas negatif, berbentuk bulat dengan diameter 100-500 nm, beberapa di antaranya berbentuk filamen, dan beramplop. Virus ND dikelompokkan menjadi tiga pathotype yaitu: lentogenik, mesogenik dan velogenik. Pengelompokkan tersebut berdasarkan atas waktu kematian embrio yakni : lentogenik adalah strain virus yang

kurang ganas ditandai dengan kematian embrio lebih dari 90 jam, mesogenik antara 60-90 jam, sedangkan velogenik kurang dari 60 jam.

Penyebaran penyakit ini biasanya melalui kontak langsung dengan ayam yang sakit dan kotorannya, melalui ransum, air minum, kandang, tempat ransum/minum, peralatan lainnya yang tercemar oleh kuman penyakit, melalui pengunjung, serangga, burung liar dan angin/udara (dapat mencapai radius 5 km). Kerugian akibat penyakit ND disebabkan karena angka kesakitan (morbiditas) maupun angka kematian (mortalitas) pada ternak unggas yang sangat tinggi yakni hingga mencapai 30-50% pada strain mesogenik dan dapat mencapai 100% akibat infeksi virus ND strain velogenik.

Hingga saat ini belum ada obat yang efektif untuk mengatasi infeksi virus ND. Tindakan utama yang dilakukan masih terbatas pada vaksinasi dan didukung oleh perbaikan tata laksana pemeliharaan ayam. Pada percobaan ini akan dilakukan uji dengan menggunakan senyawa propolis sebagai preventif secara *in vitro* dengan menggunakan kultur makrofag yang diinfeksi virus ND.

Meninjau dari uraian di atas, maka disusun proposal penelitian untuk mengetahui lebih lanjut pengaruh dari propolis dengan parameter ekspresi dari interferon dan interleukin 17. Tujuan dari penelitian ini adalah pemberian propolis mampu menurunkan produksi interferon alpha dan interleukin 17 pada kultur makrofag dari mencit yang telah diinduksi virus ND. Parameter interferon alpha dan interleukin 17 digunakan karena sitokin ini merupakan hasil ekspresi dari makrofag dan merupakan sitokin proinflamasi.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah

1. Apakah propolis memiliki efek preventif terhadap infeksi virus ND pada kultur makrofag dengan menurunkan produksi *Interferon alpha* (IFN- α)?
2. Apakah propolis memiliki efek preventif terhadap infeksi virus ND pada kultur makrofag dengan menurunkan produksi *Interleukin-17* (IL-17)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C usia 6-8 minggu dengan berat badan 20-30 gram (Rahayuningsih, 2010). Untuk kriteria eksklusif adalah tidak terdapat abnormalitas anatomi yang nampak dan mencit bergerak aktif. Mencit didapatkan dari Fakultas SAINTEK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penggunaan hewan coba sedang dalam proses untuk mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang.
2. Pembuatan kultur makrofag dalam medium RPMI dilakukan dengan menggunakan metode yang digunakan oleh Rahayuningsih (2010).
3. Virus *Newcastle Disease* yang diinfeksi pada kultur makrofag yang diperoleh dari PUSVETMA. Dosis dari virus yang diinduksikan adalah 64 HAU.

4. Propolis diambil dari peternakan lebah Rimbah Raya Lawang dalam bentuk padat berwarna coklat dan beraroma khas yang kemudian dilakukan pembuatan ekstrak propolis di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Penentuan konsentrasi propolis yang diberikan pada kultur makrofag dibedakan menjadi lima yaitu sebagai kontrol positif, negatif, 25 µg/ml, 50 µg/ml dan 100 µg/ml (Herawati, 2015).
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah produksi IFN-α dan IL-17 menggunakan uji *flowcytometri* (Rifa'i, 2011).

1.4 Tujuan penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui potensi propolis sebagai preventif terhadap kultur makrofag yang diinfeksi virus *Newcastle Disease* melalui penurunan produksi *Interferon alpha* (IFN-α).
2. Mengetahui potensi propolis sebagai preventif terhadap kultur makrofag yang diinfeksi virus *Newcastle Disease* melalui penurunan produksi *Interleukin 17* (IL-17).

1.5 Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai propolis dalam menurunkan produksi *Interferon alpha* (IFN-α) dan *Interleukin-17* (IL-17) serta sebagai referensi atau acuan dalam penelitian selanjutnya terhadap tindakan preventif terhadap virus *Newcastle Disease*.

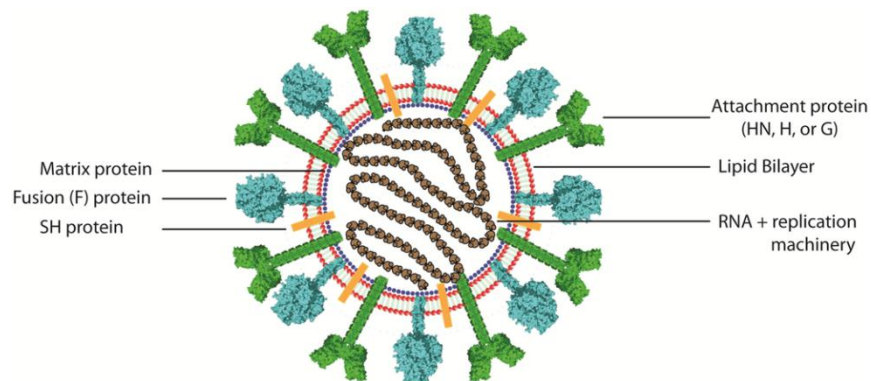
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Newcastle Disease (ND)

2.1.1. Etiologi

Salah satu penyakit menular yang sering menyerang ternak ayam adalah *Newcastle Disease* (ND). Penyakit ini disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus type-1* (APMV-1), genus *Avulavirus*, familia *Paramyxoviridae* (Al-Garib *et al.*, 2003). *Avian Paramyxovirus* terdiri dari sembilan serotype yakni APMV-1 sampai APMV-9 (OIE, 2010). Genom virus ND bersifat single-stranded (ss), berpolaritas RNA negatif dengan panjang genom 15 186 nukleotida dan tidak bersegmen. Virion dari virus ini juga dikelilingi oleh membran tipis yang terdiri 2 atas lipid bilayer, lapisan protein, dan glikoprotein yang berbentuk paku menonjol pada permukaan partikel (Alexander 2003). Secara taksonomi, virus ND dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Aldous *et al.*, 2003):

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Chordata</i>
Ordo	: <i>Mononegavirales</i>
Family	: <i>Paramyxoviridae</i>
Genus	: <i>Avulavirus</i>
Species	: <i>Newcastle disease virus</i>



Gambar 2.1. Struktur Virus *Newcastle Disease*
Sumber : (Alexander, 2003)

Virus ND dikelompokkan menjadi tiga pathotype yaitu: lentogenik, mesogenik dan velogenik. Pengelompokan tersebut berdasarkan atas waktu kematian embrio, yakni: lentogenik adalah strain virus yang kurang ganas ditandai dengan kematian embrio lebih dari 90 jam, mesogenik antara 60-90 jam, sedangkan velogenik kurang dari 60 jam (Saif, 2003). Gejala penyakit yang ditimbulkan oleh virus ND tipe lentogenik pada ternak ayam bersifat ringan atau tanpa gejala klinis. Virus ND tipe mesogenik dengan virulensi moderat (sedang) menimbulkan gejala yang dari ringan sampai sedang. Sementara itu, virus ND velogenik adalah tipe yang sangat ganas ditandai dengan penyakit yang bersifat akut dan kematian yang tinggi sampai 100%. Berdasarkan atas predileksinya dan gejala klinis yang ditimbulkan, virus ND velogenik dibedakan lagi menjadi bentuk neurotrofik dengan gejala gangguan syaraf, pneumotrofik dengan kelainan pada sistem pernafasan, dan viscerotrofik dengan kelainan pada sistem pencernaan (Aldous and Alexander, 2001).

2.1.2 Gejala Klinis

Newcastle Disease dapat dibagi atas 5 fenotipe berdasarkan gejala klinik yang timbul, yakni *viscerotropic velogenic newcastle disease* (VVND), *velogenic*

newcastle disease (NVND), *mesogenic*, *lentogenic respiratory*, dan *asymptomatic enteric*. Bentuk *Doyle* ditandai oleh adanya infeksi yang bersifat akut dan fatal pada semua umur ayam. Bentuk ini dicirikan dengan adanya gangguan pencernaan akibat perdarahan dan nekrosis pada saluran pencernaan sehingga dikenal dengan nama *viscerotropic velogenic newcastle disease* (VVND). Bentuk *Beach* ditandai oleh adanya infeksi yang bersifat akut dan kerap kali dapat menimbulkan kematian sampai 50% pada unggas dewasa dan sebesar 90% pada unggas muda. Bentuk ini dicirikan oleh adanya gejala klinis pada saluran pernafasan dan saraf sehingga disebut *neurotropic velogenic newcastle disease* (NVND). Bentuk *Beaudette* merupakan suatu bentuk virus ND galur mesogenic yang kurang patogen dan hanya dapat menyebabkan kematian pada unggas muda. Bentuk dari virus ini dapat digunakan sebagai vaksin aktif untuk vaksinasi ulang terhadap ND. Virus ND galur lentogenik ditandai oleh adanya infeksi pernapasan ringan dan tidak menimbulkan kematian pada unggas dewasa yang juga dikenal dengan bentuk *Hitchner*. Bentuk *asymptomatic enteric* tidak menimbulkan gejala suatu penyakit tertentu namun dapat ditandai dengan infeksi pada usus yang ditimbulkan oleh virus ND tipe lentogenik (Alexander 2003).

2.1.3 Patogenesis

Protein HN berperan dalam tahap penempelan virus ND pada reseptor sel inang atau induk semang yang mengandung *sialic acid*. Molekul *sialic acid* ini adalah *glycoprotein* dan *glycolipid*. Penempelan virus dilakukan dengan penyatuan virus dan membran sel yang diperantarai oleh *fusi protein*. Virus RNA kemudian dilepaskan dalam sitoplasma dan terjadi replikasi (Ferreira *et al.*, 2004).

Protein F berfungsi sebagai fusi antara amplop virus dengan membran sel inang. Hal ini memungkinkan penetrasi sel inang oleh genom virus. Pada saat fusi terjadi, bentuk protein fusi asli harus diubah. Perubahan ini terjadi ketika protease inang membelah atau memotong protein virus pada tempat pembelahan spesifik. Setelah ini protein fusi diaktifkan dan pada saat inilah terjadi fusi. Urutan asam amino disekitar tempat pembelahan akan menentukan berbagai enzim protease yang dapat mengaktifkan pembelahan protein. Urutan ini selanjutnya akan menentukan virulensi virus. Dasar molekuler untuk tingkat keganasan virus didasarkan pada perbedaan urutan substrat dari protein prekursor F0 yang digunakan untuk aktivasi enzim proteolitik (Tabbu, 2000).

Envelope virus masuk ke dalam sel melalui 2 jalan utama yaitu pertama, penyatuan secara langsung antara *envelope* virus dengan membran plasma dan kedua, diperantarai oleh reseptor endositosis. Penetrasi virus melalui reseptor endositosis tergantung pada kondisi pHnya. Pada *paramyxoviruses*, proses penyatuan membran virus dengan membran plasma inang atau induk semang tidak tergantung pH. Walaupun demikian, hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penyatuan virus ND dengan sel mampu meningkatkan pH. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa penetrasi virus ND pada sel inang melalui reseptor endositosis juga dipengaruhi oleh kondisi pH 5-9 (Alexander, 2003).

Kepekaan sel terhadap virus ND yang tidak virulen (*lentogenik* dan *mesogenik*) dipengaruhi oleh beberapa faktor. Sel tersebut harus mempunyai reseptor yang cocok sehingga virus dapat melakukan penempelan dan masuk ke dalam sel. Disamping itu, sel tersebut juga harus memiliki tripsin yang menyerupai protease dimana enzim ini

berperan dalam pemecahan protein F₀ menjadi F₁ dan F₂. Penyebaran reseptor sel pada ayam yang peka terhadap virus ND bentuk tidak virulen bersifat terbatas dan hanya ditemukan pada saluran pencernaan dan saluran pernafasan bagian atas (Alexander, 2003).

Sedangkan virus bentuk virulen (*viscerotropic velogenic, neurotropic velogenic*, dan *asymptomatic enteric*) tidak selalu memerlukan enzim protease dan replikasi virus biasanya terjadi di sebagian besar jaringan induk semang. Replikasi virus yang terjadi di limfosit menghasilkan suatu respon imun dan produksi antigen virus yang cukup dibutuhkan untuk meningkatkan efektivitas sistem imun. Di dalam saluran pencernaan terdapat faktor-faktor nonspesifik yang mempengaruhi replikasi virus ND. Enzim protease dan pH yang bervariasi mempunyai pengaruh dalam proses penempelan virus pada reseptor sel. Dimana keberadaan tripsin pada beberapa bagian saluran pencernaan dapat mengaktifkan virus ND bentuk tidak virulen setelah virus tersebut dilepaskan dari sel yang kekurangan enzim protease (Alexander, 2003).

Penelitian untuk menentukan tempat awal replikasi virus ND setelah diinfeksi virus V4 secara oral yang dilakukan oleh Bouzari dan Spardbrow (2006) menunjukkan hasil bahwa virus dapat diisolasi dari esophagus, tembolok dan trakea setelah 24 jam pasca inokulasi virus V4 melalui mulut pada ayam umur 3 minggu. Tetapi jumlah virus yang ditemukan pada organ tersebut lebih sedikit jika dibandingkan dengan organ *proventrikulus*. Virus V4 juga tidak dapat di isolasi dari organ pencernaan lain dan darah. Meskipun demikian, virus dapat dideteksi pada *jejunum*, *ileum* dan *caecum* pada 6 hari setelah diinfeksi virus V4 melalui tembolok, virus juga dapat ditemukan dalam darah pada 4 hari pasca infeksi. Antigen virus ND

dideteksi pada sebagian besar sel epitel saluran pencernaan serta limfosit dan makrofag ditemukan pada lamina propia beberapa jaringan. Hasil penelitian di atas memperlihatkan bahwa tempat awal replikasi virus ND terutama terjadi di saluran pencernaan bagian atas yaitu esophagus, tembolok dan proventrikulus apabila virus ND diinfeksi melalui mulut, sedangkan replikasi virus ND pada saluran pencernaan bagian bawah yaitu duodenum, jejunum, ileum dan caecum kemungkinan terjadi sebagai akibat viremia (Alexander, 2003).

2.1.4 Cara penularan

Virus ND yang terutama bereplikasi di dalam saluran pencernaan akan menyebabkan adanya feses yang tercemar oleh virus tersebut. Penularan virus ND juga dapat terjadi secara oral akibat ingesti feses yang mengandung virus tersebut ataupun secara tidak langsung melalui pakan atau minuman yang tercemar atau perinhalasi akibat menghirup partikel feses yang mengering (Kencana, 2011). Penyebab perbedaan keganasan diantara strain *Paramyxovirus* adalah terletak pada cepat atau lambatnya perbanyakan virus bersangkutan. Penularan virus ND dapat secara langsung dari ayam yang sakit ke ayam yang peka, tetapi dapat juga terjadi secara tidak langsung melalui bahan, alat atau pekerja yang tercemar virus tersebut. Cara penularan virus ND dari ayam yang sakit ke ayam yang peka tergantung pada tempat bereplikasi dari virus tersebut. Ayam yang menunjukkan gejala gangguan pernafasan akan menyebabkan adanya udara bercampur titik air yang mengandung virus ND yang berasal dari mukus ayam sakit. Penularan virus ND dapat terjadi secara inhalasi (Tabbu, 2000). Penularan penyakit ND secara aerosol dapat terjadi meskipun jaraknya cukup jauh yakni 64 meter dari sumber infeksi (Kencana, 2011).

2.1.5 Diagnosis

Diagnosa awal terhadap ND tipe velogenik viserotropik dapat didasarkan atas gejala klinik yang diperkuat oleh pemeriksaan patologik. ND tipe Velogenik Neurotropik bersifat kurang spesifik dibandingkan dengan VVND. Diagnosa awal untuk bentuk ini dapat didasarkan atas adanya gejala gangguan pernapasan dan gangguan saraf. Sedangkan untuk infeksi virus ND yang disebabkan oleh galur mesogenik dan lentogenik, sulit untuk didiagnosa berdasarkan gejala klinik dan perubahan patologik tertentu. Diagnosa akhir didasarkan atas isolasi dan identifikasi virus penyebab penyakit (Tabbu, 2000).

Menurut Pudjiatmoko *et al.* (2014), diagnosa penyakit *Newcastle Disease* dapat didasarkan atas epizootiologi, tanda-tanda klinis, kelainan patologi anatomi yang dikukuhkan dengan hasil pemeriksaan laboratorium, sebagai berikut:

- a) Isolasi dari swab trakea atau kloaka atau suspensi 10% dari otak atau paru, dalam larutan NaCl fisiologis yang mengandung antibiotik diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB) umur 9-11 hari.
- b) Pemeriksaan serologi, dengan menguji adanya antibodi dalam tubuh dengan uji HI, uji *Serum Neutralization* (SN) dan *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).
- c) Pengujian adanya antigen dapat dilakukan pula dengan uji *Flourescent Antibody Technique* (FAT) atau dengan *rapid test*.

2.1.6 Imunitas Terhadap Virus

Respon kekebalan non-spesifik (alamiah) terdiri dari faktor-faktor yang sudah ada sejak lahir atau sebelum tubuh terinfeksi mikroorganisme. Respon kekebalan ini

bersifat cepat dan paling awal dalam pertahanan terhadap infeksi mikroorganisme. Sistem kekebalan non-spesifik terdiri dari beberapa komponen yaitu *barrier* fisik dan kimia (bulu, kulit, mukosa); sel fagosit (makrofag, NK, neutrofil, heterofil) (Ferdous *et al.* 2008).

Infeksi virus pertama kali dikenali oleh protein inang yaitu protein TLR, Protein TLR berperan penting dalam pengenalan patogen dalam sistem imun tubuh. Sinyal berlangsung sangat cepat kemudian terjadi transkripsi faktor aktivasi yang menghasilkan interferon dan sitokin untuk menghambat replikasi virus. Respon aktivasi makrofag terdiri dari migrasi dan kemotaksis, fagositosis, dan produksi reaktif nitrogen dan oksigen. Respon ini merupakan reaksi peradangan dan membatasi penyebaran patogen. Makrofag berfungsi sebagai *antigen presenting cell* (APC), akan mengaktifkan sel T melalui *co-stimulator* molekul dan stimulator sitokin. Infeksi virus ND *strain* virulen merangsang respon gen inang IFN α , IFN β , *interleukin 1* (IL-1) dan *interleukin 6* (IL-6) dalam leukosit limpa (Rue *et al.*, 2011).

Rue *et al.* (2011) melaporkan virus ND virulen yang mengkode gen protein V mampu menekan IFN tipe I. Hal ini menyebabkan sistem kekebalan nonspesifik tidak mampu merespon infeksi tersebut sehingga mengakibatkan penyakit yang parah pada unggas. Pertahanan terhadap serangan virus akan digantikan oleh kekebalan spesifik (*adaptive immunity*) apabila kekebalan alami tidak mampu melawan infeksi virus ND. Respon kekebalan non-spesifik dan spesifik tidak dapat dipisahkan karena kedua respon ini saling melengkapi dalam melawan invasi virus ND. Hubungan antara respon kekebalan non-spesifik dan spesifik ditunjukkan dengan mekanisme makrofag sebagai APC yang berinteraksi dengan molekul dari antigen melalui TLR yang

dimilikinya, TLR berperan penting dalam pengenalan patogen dalam sistem imun tubuh. Molekul antigen tersebut akan difagositosis dan difragmentasi kemudian disajikan kepada sel T. Reaksi ini selanjutnya akan mempengaruhi terjadinya aktivasi sel T. Begitu pula sebaliknya, aktivasi sel T akan menghasilkan sitokin yang akan mengaktifasi makrofag (Scott & Owens, 2008).

2.1.7 Pengendalian dan Pencegahan

Tujuan dari pengendalian ND adalah mencegah ayam yang peka agar tidak terinfeksi oleh virus tersebut atau mengurangi jumlah ayam yang peka dengan program vaksinasi. Untuk mencegah masuknya dan menyebarnya virus ND ke dalam suatu peternakan, maka diperlukan pengamanan biologis yang ketat dan pelaksanaan aspek manajemen lainnya secara optimal untuk menghilangkan faktor pendukung/sumber infeksi virus. Sistem perkandangan, sanitasi/desinfeksi, kualitas DOC, kualitas dan kuantitas pakan, pengaturan pekerja atau pengujung dan sistem transportasi sapronak/pronak juga penting untuk diperhatikan. Pengamanan biologis yang ketat perlu didukung oleh program vaksinasi terhadap ND yang sesuai untuk merangsang timbulnya kekebalan pada suatu kelompok ayam yang peka (Tabbu, 2000).

2.2. Interferon- α (IFN- α)

Interferon adalah hormon berbentuk sitokin berupa protein berjenis glikoprotein yang disekresi oleh sel vertebrata karena akibat rangsangan biologis, seperti virus, bakteri, protozoa, mycoplasma, mitogen, dan senyawa lainnya. Sejarah penemuan interferon dimulai pada tahun 1954 ketika Nagano dan Kojima menemukannya pada virus di kelinci. Tiga tahun kemudian Isaacs dan Lindenmann berhasil mengisolasi

molekul yang serupa dari sel ayam dan molekul tersebut disebut interferon (Gilman *et al.*, 2001).

Interferon adalah senyawa kimia yang terjadi secara alami protein yang dibuat dan disekresikan oleh sel-sel dari sistem kekebalan tubuh (misalnya, sel-sel darah putih, sel-sel pembunuh alami, fibroblas, dan sel epitel). Tiga kelas interferon telah diidentifikasi : alfa, beta, dan gamma. Setiap kelas memiliki banyak efek, meskipun efek mereka tumpang tindih. Interferon tersedia secara komersial interferon manusia diproduksi menggunakan teknologi DNA rekombinan. Mekanisme aksi interferon adalah kompleks dan tidak dipahami dengan baik. Interferon memodulasi respon dari system kekebalan tubuh terhadap virus, bakteri, kanker, dan zat asing lainnya yang menyerang tubuh. Interferon tidak secara langsung membunuh sel virus atau kanker, mereka meningkatkan respon system kekebalan tubuh dan mengurangi pertumbuhan sel kanker dengan mengatur tindakan dari beberapa gen yang mengontrol sekresi banyak protein seluler yang mempengaruhi pertumbuhan.

Menurut Moreland (2004) terdapat tiga kategori interferon yaitu, alfa, beta, dan gamma.

1. Interferon- α dihasilkan oleh leukosit dan berperan sebagai molekul anti-viral (Moreland, 2004). Penggunaan interferon- α untuk perawatan penderita hepatitis B dan hepatitis C dapat menginduksi hipotiroidisme, tiroiditis maupun disfungsi kelenjar tiroid (Warddan Bing-You. 2001). IFN- α memiliki efek anti-proliferatif dan anti-fibrosis pada sel mesenkimal (Schuppan. 2003).
2. Interferon- β dihasilkan oleh fibroblas dan dapat bekerja pada hampir semua sel di dalam tubuh manusia anti-viral (Moreland. 2004).

3. Interferon- γ dihasilkan oleh limfosit sel T pembantu dan hanya bekerja pada sel-sel tertentu, seperti makrofag, sel endotelial, fibroblas, sel T sitotoksik, dan limfosit B anti-viral (Moreland. 2004).

Interferon, terutama IFN- α dan IFN- β memiliki peranan penting dalam pertahanan terhadap infeksi virus. Senyawa interferon adalah bagian dari sistem imun non-spesifik dan senyawa tersebut akan terinduksi pada tahap awal infeksi virus, sebelum sistem imun spesifik merespon infeksi tersebut. Pada saat rangsangan atau stimulus biologis terjadi, sel yang memproduksi interferon akan mengeluarkannya ke lingkungan sehingga interferon dapat berikatan dengan reseptor sel target dan menginduksi transkripsi dari 20-30 gen pada sel target. Hal ini menghasilkan keadaan anti-virus pada sel target. Aktivasi protein interferon terkadang dapat menimbulkan kematian sel yang dapat mencegah infeksi lebih lanjut pada sel (Richard H. 2009).

2.3 Interleukin-17 (IL-17)

Interleukin 17 merupakan sitokin yang bertindak sebagai mediator ampuh dalam menunda ekspresi dengan meningkatkan produksi kemokin dalam berbagai jaringan, mirip dengan Interferon gamma. IL-17 yang diproduksi oleh sel T-helper dan diinduksi oleh IL-23 (Kuby *et al*, 2007). Interleukin 17 berperan sebagai sitokin proinflamasi yang merespon invasi sistem kekebalan tubuh oleh patogen intraseluler dan menginduksi kerusakan matriks seluler patogen. Interleukin 17 bertindak sinergis dengan *tumor necrosis factor* dan interleukin-1 (Chiricozzi A, 2010).

IL-17 berikatan dengan reseptor permukaan sel yang disebut tipe I IL-17R yang mempunyai tiga varian IL-17RA, IL-17RB, dan IL-17RC. Interleukin 17 berfungsi meregulasi imun. Peran paling penting dari IL-17 adalah keterlibatannya dalam mendorong dan mediasi respon proinflamasi. IL-17 umumnya terkait dengan respon alergi (Starnes T *et al*, 2002).

IL-17 menginduksi produksi sitokin lainnya (seperti IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α), kemokin (termasuk IL-8, GRO- α , dan MCP-1), dan prostaglandin misalnya (PGE₂) dari banyak jenis sel (fibroblast, sel-sel endotel, sel epitel, keratinosit dan makrofag). Pelepasan sitokin menyebabkan banyak peran, seperti remodeling saluran napas. Fungsi IL-17 juga penting untuk subset dari CD4 + T-Sel yang disebut T helper 17 (Th17) sel. IL-17 telah dikaitkan dengan banyak penyakit kekebalan autoimun terkait termasuk rheumatoid arthritis, asma, lupus, allograft, kekebalan anti-tumor dan baru-baru psoriasis (Starnes T *et al.*, 2002).

2.4 Makrofag

Makrofag merupakan sel fagosit yang hampir ditemui pada setiap organ diseluruh tubuh, terutama pada jaringan ikat longgar. Makrofag termasuk mononuklear fagosit sistem, makrofag merupakan suatu sistem yang dulu disebut dengan *Retikulo Endotelial Sistem* (RES), ini merupakan istilah bersama untuk sel-sel yang sangat fagositik yang tersebar luas diseluruh tubuh terutama pada daerah yang kaya akan pembuluh darah. Perkembangan makrofag terutama berasal dari sel prekursor dari sum-sum tulang, dari promonosit yang akan membelah menghasilkan monosit yang beredar dalam darah. Pada tahap kedua monosit bermigrasi kedalam

jaringan ikat tempat mereka menjadi matang dan inilah yang disebut makrofag (Efendi, 2003).

Di dalam jaringan makrofag dapat berproliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis lebih banyak. Pada penelitian yang terutama menggunakan sel berlabel radioaktif mendapatkan bahwa kebanyakan bahkan mungkin semua, sel fagositik ini berasal dari promonosit sel mononuklear yang berasal dari sum-sum tulang. Monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag yang memproduksi berbagai macam sitokin (TNF- α , IL-1, IL-10, IL-6 TGF- β), kemokin (IL-8, MCP-1), *growth factor*, *metalloproteinase* dan dapat memodifikasi lipoprotein melalui oksidasi (Efendi, 2003).

Sel-sel sistem makrofag diantaranya terdapat pada jaringan ikat longgar berupa histiosit, didalam darah berupa monosit, didalam hati melapisi sinusoid dikenal sebagai sel Kupffer, makrofag perivaskuler sinusod limpa, limfonodus, dan sum-sum tulang, dan pada susunan syaraf pusat berupa mikroglia yang berasal dari mesoderm (Efendi, 2003).

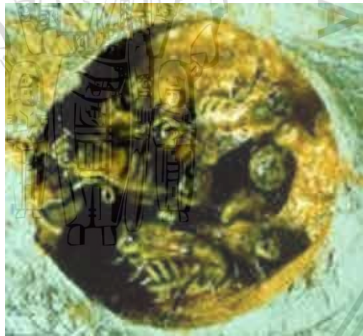
2.5 Propolis

Propolis atau lem lebah adalah suatu zat yang dihasilkan oleh lebah madu, mengandung resin dan lilin lebah, bersifat lengket yang dikumpulkan dari sumber tanaman, terutama dari bunga dan pucuk daun, untuk kemudian dicampur dengan air liurlebah (Marcucciet *al.*, 2001, Salatino *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2009). Warna propolis umumnya bervariasi dari kuning terang hijau hingga coklat kemerahan. Propolis digunakan untuk menutup sel-sel atau ruang heksagonal pada sarang lebah.

Biasanya, propolis menutup celah kecil berukuran 4-6 mm, sedangkan celah yang lebih besar diisi oleh lilin lebah (Salatino *et al.*, 2005).

Sihombing (2005) menyebutkan taksonomi lebah *Trigona* spp. selengkapnya adalah sebagai berikut :

Divisi	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Hymenoptera
Subordo	: Apocrita
Famili	: Apidae
Subfamili	: Apinae
Tribe	: Meliponini
Genus	: <i>Trigona</i>
Species	: <i>T. carbonaria</i> , <i>T. hockingsii</i> , <i>T. iridipennis</i> , <i>T. spinipes</i> .



Gambar 2.2 Lebah Penghasil Propolis
(Sumber: Value Added Products of Beekeeping by R Krell, FAO).

Salah satu jenis lebah yang mampu menghasilkan propolis dalam jumlah banyak yaitu jenis *Trigona sp* (Sabir, 2009). Spesies lebah madu yang juga aktif mencari propolis adalah *Apis Mellifera* (Salatino *et al.*, 2005). Hanya lebah betina pekerja yang bertugas mencari polen sebagai bahan baku propolis, mengolah propolis dari berbagai bahan seperti pucuk daun, getah tumbuhan, dan kulit beragam

tumbuhan seperti akasia dan pinus. Lebah jantan tidak mempunyai kantong polen di bagian tibia atau tungkai kaki dan tanpa kelenjar malam, itulah sebabnya tidak mampu mencari dan mengangkut polen ke sarang. (Ensiklopedi Indonesia, 2003).

2.5.1 Karakteristik Propolis

Warna propolis bervariasi, dari kuning, hijau hingga coklat tua, tergantung pada sumber tumbuhannya, seperti propolis Brazil (Cuba) berwarna kehijauan (**Gambar 2.5**) (Salatino, 2005). Propolis merupakan substansi resin alami yang mempunyai aroma wangi, sangat lengket pada suhu sarang saat baru dibentuk, mengeras pada suhu 15°C, dan menjadi mudah pecah di bawah suhu 5°C. Pada suhu 25°-45°C, propolis bersifat lembut, elastic dan sangat lengket. Di atas suhu 45°C, propolis semakin lengket seperti karet. Sementara pada suhu 60° dan 70°-100°C propolis akan mencair (Salatino, 2005).

2.5.2 Kandungan Propolis

Propolis terdiri dari resin (50%), wax (30%), *essential oils* (10%), pollen (5%), dan komponen organik (5%) (Gomez *et al.*, 2006). Resin mengandung flavonoid, fenol, dan berbagai bentuk asam (Borelli *et al.*, 2002). Salah satu ikatan fenol yang ada dalam propolis yaitu *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) (Viuda *et al.*, 2008). CAPE merupakan sisi aktif flavonoid yang bekerja untuk memaksimalkan aktivitas *scavenger* terhadap radikal bebas, dengan cara menurunkan aktivitas radikal hidroksil (-OH) sehingga tidak terlalu reaktif lagi (Cadenas and Packer, 2002 (c)).

Propolis mengandung 16 asam amino esensial yang dibutuhkan untuk regenerasi sel. Dari semua asam amino yang terdapat dalam propolis, arginin dan prolin tergolong yang terbanyak, sekitar 45,8%. Propolis mengandung semua

mineral, kecuali sulfur. Zat besi (Fe) dan seng (Zn) adalah kandungan yang terbanyak. Kandungan mineral ini sangat dipengaruhi oleh lingkungan tempat tumbuh tanaman. Propolis juga mengandung vitamin, di antaranya vitamin A, vitamin B (B1, B2, B6), vitamin C, vitamin E dan vitamin D (Borelli *et al.*, 2002).

Hal ini didukung oleh Ugar *et al.*, (2004) yang menyatakan bahwa kandungan flavonoid dalam propolis menyebabkan propolis berfungsi sebagai antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, antitumor dan imunostimulator.

2.5.3 Jenis-Jenis propolis

Berikut ini adalah beberapa bentuk propolis yang sudah diproduksi massal (Borelli *et al.*, 2002):

1. Propolis mentah, yaitu propolis tanpa melalui proses pematangan (mentah), bisa langsung dikonsumsi. Umumnya berbentuk bongkahan atau dibekukan. Bongkahan besar propolis murni dapat dikunyah, seperti permen karet. Namun sebaiknya dikonsumsi dalam jumlah sedikit, jika berlebihan menyebabkan gangguan pada perut. Selain itu ada propolis mentah yang dihancurkan hingga menjadi butiran halus. Butiran halus biasanya dimasukkan dalam kapsul atau dicampur dengan makanan dan minuman.
2. Propolis cair, adalah propolis bentuk cair, yang telah diekstrak dengan jenis pelarut tertentu. Ada banyak jenis pelarut yang dapat digunakan, di antaranya etanol (alkohol), air, pelarut minyak sayur atau lemak hewan.
3. Propolis bubuk (powder). Sebelum diproses menjadi bentuk bubuk atau powder, propolis mentah (raw propolis) terlebih dahulu diekstrak dengan alkohol, air, atau

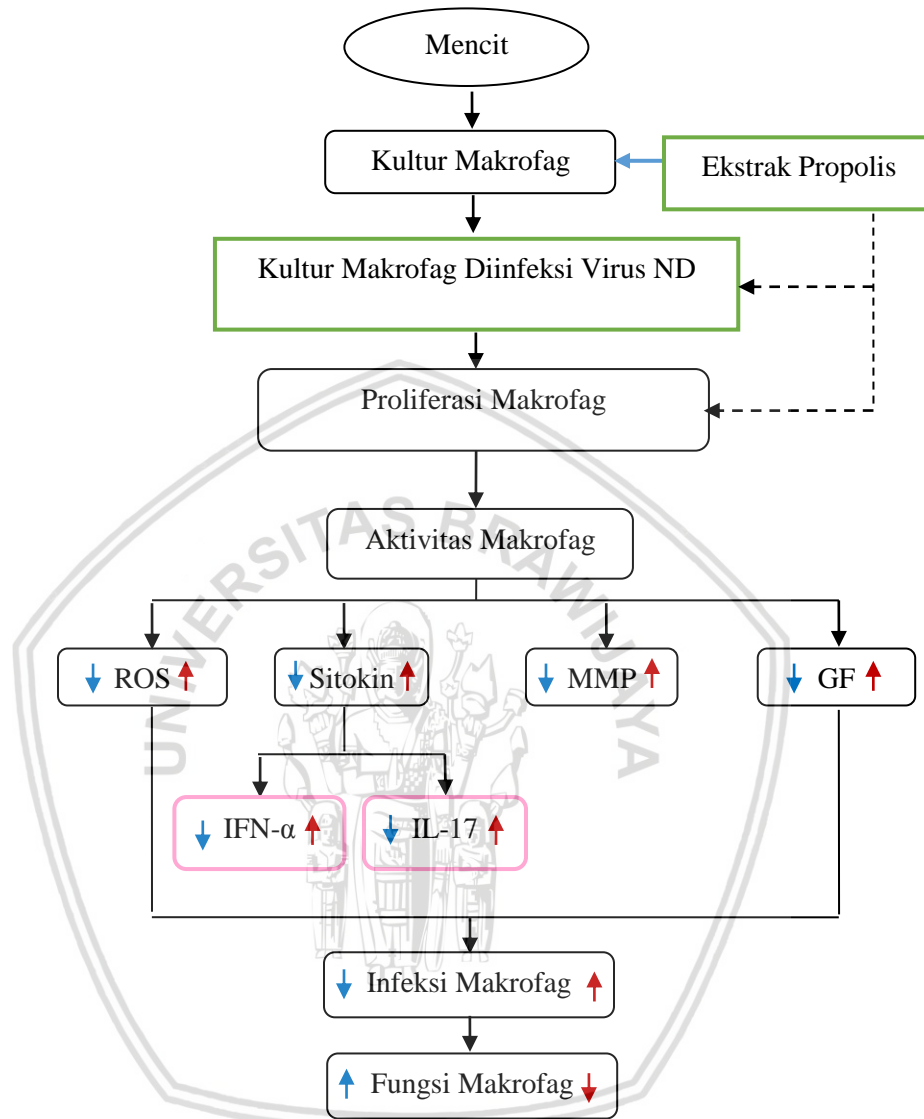
ekstrak glikol. Bentuk propolis bubuk di pasaran dapat ditemukan dalam bentuk tablet atau kapsul.

4. Injeksi. Hingga kini ketersediaan propolis injeksi masih dalam penelitian.
5. Pasta dan minyak propolis. Salah satunya adalah pasta gigi propolis, yang bermanfaat untuk mencegah karies, radang gusi, dan sariawan. Selain dalam bentuk pasta, propolis juga bisa dicampur dengan minyak atau krim untuk dioleskan.



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :



: Variabel Terikat

→ : Induksi NDV



: Variabel Bebas

→ : Pemberian ekstrak Propolis

↑↓ : Efek Pemberian ekstrak Propolis

↑↓ : Efek Pemberian NDV

Pada saat NDV diinfeksi ke dalam kultur makrofag, antigen akan dikenali pertama kali oleh TLR dan MHC 1. MHC 1 akan mempresentasikan antigen tersebut pada sel T CD8. Makrofag berfungsi melalui proses fagositosis dengan membunuh, menghancurkan, dan mengeliminasi antigen dari tubuh. Aktivasi dari sel T akan menghasilkan sitokin proinflamasi, diantaranya adalah IFN- α dan IL-17. Keberadaan dari sitokin ini akan memacu kerja dari makrofag dalam mengatasi antigen. Interleukin 17 berfungsi meregulasi imun. Peran paling penting dari IL-17 adalah keterlibatannya dalam mendorong dan mediasi respon proinflamasi (Starnes T *et al*, 2002).

Reactive oxygen species (ROS) adalah komponen esensial pada respon imun innate untuk melawan mikroorganisme intraseluler. ROS berperan penting dalam killing serta merupakan salah satu *lethal chemical* yang dapat membunuh dan mengeliminasi mikroorganisme patogen (West *et al.*, 2011). *Matrix metalloproteinase* (MMP) mampu untuk mendegradasi molekul ekstraselular secara luas. *Matrix metalloproteinase* (MMP) memegang peranan penting dalam proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, angiogenesis, apoptosis dan pertahanan tubuh. *Growth factor* (GF) adalah zat alami yang mampu merangsang pertumbuhan sel, proliferasi, penyembuhan, dan diferensiasi sel.

Selain IL-17, makrofag juga memproduksi IFN- α sebagai respon adanya infeksi. *Interferon- α* (IFN- α) memiliki peranan penting dalam pertahanan terhadap infeksi virus. Senyawa interferon adalah bagian dari sistem imun non-spesifik dan senyawa tersebut akan terinduksi pada tahap awal infeksi virus, sebelum sistem imun spesifik merespon infeksi tersebut. Pada saat rangsangan

atau stimulus biologis terjadi, sel yang memproduksi interferon akan mengeluarkannya ke lingkungan sehingga interferon dapat berikatan dengan reseptor sel target dan menginduksi transkripsi dari 20-30 gen pada sel target. Hal ini menghasilkan keadaan anti-virus pada sel target. Aktivasi protein interferon terkadang dapat menimbulkan kematian sel yang dapat mencegah infeksi lebih lanjut pada sel (Konsek and Konsekova, 2007).

Propolis atau lem lebah adalah suatu zat yang dihasilkan oleh lebah madu, mengandung resin dan lilin lebah, bersifat lengket yang dikumpulkan dari sumber tanaman, terutama dari bunga dan pucuk daun, untuk kemudian dicampur dengan air liur lebah (Marcucci *et al.*, 2001, Salatino *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2009). Menurut Ugar *et al.*, (2004) kandungan flavonoid dalam propolis menyebabkan propolis berfungsi sebagai antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, antitumor dan imunostimulator. Wade (2005) menjelaskan bahwa propolis dapat merangsang sistem kekebalan tubuh secara langsung dan melepaskan unsur yang merespon imunitas seluler melalui mekanisme fagositosis. Kerja dari propolis sebagai preventif dapat menekan atau menurunkan produksi interferon alpha dan interleukin 17 ketika diinfeksi NDV.

Saat NDV mulai menginfeksi, produksi dari IFN- α dan IL-17 akan meningkat. Peranan yang menguntungkan dari IFN- α diantaranya sebagai respon imun terhadap bakteri, jamur, virus, dan invasi parasit. Apabila Propolis dapat memberikan efek preventif terhadap infeksi ND, produksi IFN- α dan IL-17 akan dicegah untuk mengalami peningkatan (Konsek and Konsekova, 2007).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini :

1. Pemberian ekstrak propolis memiliki efek preventif terhadap kultur makrofag yang diinfeksi virus ND dengan menurunkan produksi *Interferon alpha* (INF- α).
2. Pemberian ekstrak propolis memiliki efek preventif terhadap kultur makrofag yang diinfeksi virus ND dengan menurunkan produksi *Interleukin 17* (IL-17).



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan oktober hingga desember 2016. Pelaksanaan penelitian terdiri atas beberapa tahapan meliputi pembuatan ekstrak Propolis di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tahapan aklimatisasi mencit dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Malang. Preparasi *Newcastle Disease Virus* (NDV) di Laboratorium Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Pembuatan kultur Makrofag dilaksanakan di laboratorium Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengujian kandungan propolis dilakukan di Balai Materia Medica Batu Malang dan tahapan pemeliharaan dan perlakuan mencit dilaksanakan di Laboratorium Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahapan pengukuran *Interferon alpha* (IFN- α) dan *Interleukin-17* (IL-17) menggunakan teknik *flowcytometry* dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan (MIPA) Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat Penelitian

Alat pemeliharaan hewan coba terdiri atas kandang kotak plastik dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm untuk setiap kelompok perlakuan, tempat pakan dan minum, tutup kandang yang terbuat dari kawat, alas kandang berupa sekam, lampu serta meja untuk meletakkan kandang. Alat yang digunakan untuk preparasi dan pembuatan kultur makrofag terdiri atas mikropate 24 sumuran, blade, tabung sentrifuse steril, hemasitometer, spuit 10 cc, inkubator CO₂, coverslip. Alat preparasi virus ND adalah

plat Titier mikro 96 sumuran dengan dasar U, peneropong telur, pengebor telur, spuit 1 ml, forceps, gunting, inkubator telur (37°C, 62% kelembaban), dan mikropipet. Alat untuk membuat ekstrak propolis adalah *rotary evaporator*, corong gelas, pipet, erlenmeyer 500 ml dan 1000 ml, pengaduk, kertas saring, *thermostirer*, *vortex*, waterbath, aluminium foil, kulkas, thermometer, dan botol untuk menyimpan dosis. Alat untuk pengujian *flowcytometry* terdiri atas mikrotube, sentrifuge tube, mikropipet 10 dan 1000 mikroliter, sentrifugator, tabung sentrifus, masker, sarung tangan, tissue, kuvet, *Software Cell Quest Pro*TM dan *BD FACS Calibur*TM *flowcytometer*.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi virus *Newcastle Disease* yang diperoleh dari PUSVETMA, Mencit Balb/C, bahan pemeliharaan hewan coba yaitu pakan, air minum dan sekam. Bahan preparasi virus ND berupa *Phospat Buffered Saline* (PBS) dan alkohol 70%. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan propolis adalah propolis yang diambil dari peternakan lebah Rimbah Raya Lawang, etanol dan DMSO (*Dimetil Sulfoxide*). Bahan yang digunakan untuk preparasi NDV adalah telur berembrio, alkohol 70%, lilin yang telah dicairkan, RBC 10% (*Washed red blood cells*), PBS (*Phospat Buffered Saline*). Bahan yang digunakan untuk pembuatan kultur makrofag terdiri atas alkohol 70%, larutan RPMI dingin, PBS, medium komplet (RPMI 1640, FBS 10%, penicillin dan streptomycin), asam asetat 3%. Bahan pada uji *flowcytometry* terdiri atas PBS steril, antibodi intraseluler (IFN- α) dan antibodi intraseluler (IL-17).

4.3 Tahapan Penelitian

Berikut ini adalah tahapan penelitian yang dilakukan:

1. Persiapan hewan coba
2. Rancangan penelitian
3. Variabel penelitian
4. Pembuatan ekstrak propolis
5. Pembuatan kultur makrofag dari peritoneum mencit
6. Pemberian ekstrak propolis pada kultur makrofag
7. Preparasi virus ND
8. Pemberian virus ND pada kultur makrofag
9. Penentuan produksi IFN- α dan IL-17 dengan *flowcytometry*

4.4. Langkah Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan umur 6 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang kemudian akan diambil makrofag sebagai bahan kultur. Sebelumnya mencit diadaptasi selama seminggu, dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Strain yang dipilih adalah Balb/C sebab strain ini dapat menimbulkan respon imunitas seluler apabila mencit diinokulasi dengan virus *Newcastle Disease*. Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit Balb/c karena merupakan mencit yang sering digunakan pada penelitian bertujuan umum maupun penelitian di bidang imunologi (Mangkoewidjojo, 2006).

4.4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu penggunaan media yang sama atau dianggap seragam dalam penelitian (Kusriningrum, 2008). Penelitian menggunakan metode *Post test only control group design* dimana percobaan (eksperimen) yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Pengukuran parameter produksi IFN- α dan IL-17 dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak propolis pada kultur makrofag yang diinduksi virus ND. Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yang berbeda, antara lain:

1. Kelompok A (kontrol negatif): Kultur makrofag yang tidak diinduksi virus ND dan ekstrak propolis.
2. Kelompok B (kontrol positif): Kultur makrofag yang diinduksi virus ND dosis 64 HAU dan tidak diberi ekstrak propolis.
3. Kelompok C (perlakuan satu): Kultur makrofag yang diinduksi virus ND dosis 64 HAU kemudian diberi ekstrak propolis dosis 25 $\mu\text{g/ml}$.
4. Kelompok D (perlakuan dua): Kultur makrofag yang diinduksi virus ND dosis 64 HAU kemudian diberi ekstrak propolis dosis 50 $\mu\text{g/ml}$.
5. Kelompok E (perlakuan tiga): Kultur makrofag yang diinduksi virus ND dosis 64 HAU kemudian diberi ekstrak propolis dosis 100 $\mu\text{g/ml}$.

Jumlah hewan coba yang diperlukan dalam penelitian dapat ditentukan dalam jumlah sampel minimal menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Kusriningrum, 2008).

Kemudian dari hewan coba ini akan diambil makrofag dan digunakan sebagai bahan kultur makrofag.

Sehingga:

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

$$5(n-1) \geq 15$$

p = jumlah kelompok perlakuan

$$5n-5 \geq 15$$

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 15+5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan lebih besar sama dengan empat atau minimal empat kali ulangan dalam setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan empat kali ulangan dalam setiap kelompok perlakuan sehingga jumlah kultur makrofag yang diperlukan sebanyak 20 ulangan kultur makrofag. Kultur makrofag kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3.

4.4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak propolis dengan dosis bertingkat 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml. Penetapan dosis yang digunakan didasarkan pada modifikasi dari penelitian yang telah dilakukan oleh Herawati *et al* (2015). Variabel bebas lain adalah virus ND yang diberikan dengan dosis 64 HAU.

2. Variabel tidak bebas (variabel terikat)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah IFN-α dan IL-17

3. Variabel kontrol (variabel kendali)

Variabel kontrol dalam penelitian ini antara adalah mencit yang homolog yaitu strain Balb/C, umur 6-8 minggu, jenis kelamin jantan, berat badan 20-30 gram, pakan yang diberikan seragam yaitu pakan standar berbentuk pelet (Mangkoewidjojo, 2006).

4.4.4 Pembuatan Ekstrak Propolis

Proses pembuatan ekstrak propolis lebah dilakukan dengan teknik maserasi. Propolis kering dibersihkan dan diblender hingga halus selanjutnya ditimbang sebanyak 500 gram, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker. Proses maserasi dilakukan dengan menambahkan 3,75 liter etanol 95% sebagai pelarut (Trusheva *et al.*, 2007). Campuran bahan disimpan selama 7 hari pada ruangan yang tidak terkena sinar matahari dengan dikocok kuat atau pengadukan dengan spatula pengaduk sebanyak 2 kali tiap hari (Susilo, 2007).

Langkah pertama adalah mengekstraksi propolis dengan etanol sebagai pelarut memakai perbandingan propolis : etanol adalah 1:10. Alat yang digunakan yaitu thermostirer berkecepatan 150 rpm selama 4 jam. Hasilnya disaring dengan menggunakan kertas saring sehingga didapat filtrate propolis. Filtrate dipisahkan dari pelarut dengan cara penguapan dalam *rotary evaporator* pada suhu 70°C berkecepatan 2-3 rpm (Jaya *et al*, 2008).

4.4.5 Penentuan Dosis Ekstrak Propolis

Penelitian ini menggunakan konsentrasi ekstrak propolis untuk virus uji 0% (kontrol positif), 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$. Penentuan besarnya dosis yang akan diberikan pada hewan coba, dilakukan analogi dengan dosis terhadap manusia. Pengenceran untuk mendapatkan dosis yang diinginkan menggunakan *Sulfoxide Dimetil* (DMSO) yang merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar. Alasan menggunakan DMSO karena pelarut ini cepat meresap ke dalam epitel ekstrak tanpa merusak sel-sel tersebut dan sering digunakan dalam bidang kedokteran dan kesehatan. Jumlah dari ekstrak propolis yang dimasukkan ke dalam sumuran adalah 500 μl . Dalam media perlakuan terdapat komposisi sebagai berikut :

Perlakuan C : 500 μl makrofag + 25 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak propolis + suspensivirus ND
100 μl

Perlakuan D : 500 μl makrofag + 50 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak propolis + suspensi virus ND
100 μl

Perlakuan E : 500 μ l makrofag + 100 μ g/ml ekstrak propolis + suspensi virus ND

100 μ l

4.4.6 Pembuatan Kultur Makrofag

4.4.6.1 Isolasi Makrofag

Prosedur dibawah ini dilakukan untuk mendapatkan 5×10^5 sel/ml. Mencit dieuthanasia dengan cara dislokasi servikalis, kemudian mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit abdomen dibuka sehingga tampak peritoneum kemudian dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diinjeksi dengan 10cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum. Peritoneum dipijat pelan untuk mendapatkan makrofag yang cukup banyak. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan dalam tabung sentrifuse steril. Cairan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah sel dicuci dengan PBS (*Phosphate-buffered Saline*) sampai bersih (Rahayuningsih, 2010).

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3cc *RPMI 1640*, *penicillin* dan *streptomycin*. Sel-sel dihitung dengan haemositometer. Makrofag diwarnai dengan TB dengan perbandingan 1:1. Campuran makrofag dan TB (*Trypan Blue*) dimasukkan ke dalam haemositometer dengan kemiringan 45° , sampel dimasukan pada dua sisi pengisian lalu didiamkan selama 1 menit sebelum dilakukan perhitungan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Sel-sel hidup (tak terwarnai) oleh larutan biru tripan disebabkan integritas dari membran yang baik. Sel-sel yang mati akan menyerap zat warna biru tripan oleh karena susunan atau integritas

membran selnya telah rusak sehingga biru tripan akan masuk melalui lubang-lubang membran sel ke dalam sel (sitoplasma) (Rahayuningsih, 2010).

Cara perhitungan sel adalah :

- a) Sel yang menempel pada garis kanan dan bawah dimasukkan dalam perhitungan, sedangkan yang menempel pada garis kiri dan atas tidak dihitung. Sel yang menggumpal dihitung sebagai satu sel.
- b) Diperkirakan jumlah sel dalam satu kotak besar 20-60 atau 100-300 dalam 4 kotak besar. Apabila lebih banyak, maka harus dilakukan pengenceran lagi.
- c) Jumlah sel per ml atau jumlah sel yang hidup per ml didalam suspensi dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Total sel/ml} = \frac{\text{totalsel}}{4} \times \frac{1}{\text{faktorpengenceran}} \times 10^4$$

$$\text{Jumlah sel hidup} = \frac{\text{selhidup}}{4} \times \frac{1}{\text{faktorpengenceran}} \times 10^4$$

Setelah dilakukan perhitungan sel dalam suspensi sampel, maka dilakukan pengenceran dengan densitas 5×10^5 sel/ml dengan rumus $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$.

4.4.6.2 Kultur Makrofag

Suspensi sel yang kemudian dapat dikultur dalam medium komplit (RPMI 1640, penicillin dan streptomycin) di dalam mikropate 24 sumuran dasar rata, masing-masing sumuran 500 mikroliter (500.000 sel/ml) dan pada dasarnya diberi coverslip, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml dalam setiap sumuran dan diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu sel dicuci RPMI dua kali dan ditambahkan

medium komplit 1 ml dalam setiap sumuran dan diinkubasi dan dilanjutkan sampai 24 jam (Rahayuningsih, 2010).

4.4.7 Pemberian Ekstrak Propolis pada Kultur Makrofag

Penelitian ini menggunakan konsentrasi ekstrak propolis untuk uji virus ND meliputi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml. Kultur makrofag yang ada dalam sumuran sejumlah 500 µl diberi ekstrak propolis sebanyak 500 µl. Kemudian diinkubasi selama 24 jam (Rahayuningsih, 2010).

4.4.8 Preparasi Virus ND

4.4.8.1 Membiakkan Virus ND Pada Telur Ayam Berembrio

Virus dibiakkan pada media TAB berumur 9-11 hari. Telur diteropong terlebih dahulu untuk memastikan tempat injeksi. Kemudian telur disterilkan pada tempat injeksi. Setelah virus diinokulasikan, lubang ditutup menggunakan parafin. telur diamati setelah 16-18 jam lalu 48 jam kemudian telur disimpan dalam suhu 4°C (Rahayuningsih, 2010).

4.4.8.2 Hemagglutination (HA) Test

Uji HA dilakukan untuk mengetahui titer dari virus, kemampuan virus dalam menginfeksi yang ditandai dengan adanya hemaglutinasi eritrosit yang akan diinduksikan pada kultur makrofag. Hal pertama yang dilakukan adalah memamsukkan 0,025 PBS dari sumuran 2-12. Suspensi virus dimasukkan ke dalam sumuran 1 sebanyak 0,1 ml. Selanjutnya ambil 0,1 ml dari sumuran 1 dan campurkan ke sumuran 2 sampai ke sumuran ke-11. Ambil 0,1 ml pada sumuran ke-11 untuk di buang. Kemudian ditambahkan 0,1 RBC ke semua sumuran lalu campur hingga

homogen. Sumuran ke-12 hanya berisi PBS dan RBC karena digunakan sebagai kontrol negatif. Jika sudah terjadi endapan eritrosit pada sumuran ke-12, maka dapat diamati aglutinasi yang terjadi pada dasar sumuran dengan memiringkan plat titer mikro. Kontrol positif berisikan PBS, RBC dan virus ND sedangkan kontrol negatif hanya berisi PBS dan RBC. Endapan yang tidak dapat mengalir merupakan positif HA (OIE. 2010).

4.4.8.3 Pemberian Virus ND pada Kultur Makrofag

Kultur makrofag yang sudah diberi ekstrak kemudian diinkubasi selama 24 jam lalu diinduksi virus ND dengan dosis infeksi 64 HAU. Kemudian dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam (Herawati *et al*, 2015).

4.4.9 Penentuan Produksi IFN- α dengan *Flowcytometry*

Kultur makrofag yang sudah diinduksi dengan NDV dan diberi ekstrak propolis dengan berbagai macam dosis ditambahkan PBS sebanyak 1 ml, lalu dihomogenkan dengan cara *pipetting*. Setelah itu diambil 100 μ l kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* baru. Selanjutnya ditambahkan 500 μ l PBS, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit 42 dengan suhu 4°C. Hasil dari sentrifugasi diambil bagian peletnya kemudian ditambahkan *antibodi cell surface molecule* yang digunakan untuk staining molekul permukaan sel (CD11B) sebanyak 50 μ l, lalu diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 4°C. Setelah itu ditambahkan *cytofix cytoperm* yang berfungsi untuk fiksasi dan permeabilisasi sel untuk pewarnaan sitokin intraseluler dengan antibodi anti-sitokin fluorochrome-terkonjugasi sebanyak 100 μ l, kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu

4⁰C, lalu ditambahkan washperm untuk mencuci sel-sel dan untuk mencairkan antibodi anti-sitokin untuk pewarnaan 1 ml dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Setelah didapatkan pelet hasil sentrifugasi ditambahkan antibodi intraseluler (IFN- α) 50 μ l, kemudian ditambahkan 300 μ l PBS, lalu dimasukkan dalam kuvet *flowcytometry* untuk dirunning (Rifa'i, 2011).

4.4.10 Penentuan Produksi IL-17 dengan *Flowcytometry*

Kultur makrofag yang sudah diinduksi dengan NDV dan diberi ekstrak propolis dengan berbagai macam dosis ditambahkan PBS sebanyak 1 ml, lalu dihomogenkan dengan cara *pipetting*. Setelah itu diambil 100 μ l, kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* baru. Selanjutnya ditambahkan 500 μ l PBS, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Hasil dari sentrifugasi diambil bagian peletnya kemudian ditambahkan *antibodi cell surface molecule* yang digunakan untuk staining molekul permukaan sel (CD11B) sebanyak 50 μ l, lalu diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 4⁰C. Setelah itu ditambahkan *cytofix cytoffermy* yang berfungsi untuk intraseluler sitokin pewarnaan sebanyak 100 μ l, kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4⁰C, lalu ditambahkan washperm 1 ml dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Setelah didapatkan pelet hasil sentrifugasi ditambahkan IL-17 sebanyak 50 μ l, kemudian ditambahkan 300 μ l PBS, lalu dimasukkan ke dalam kuvet *flowcytometry* untuk dirunning (Rifa'i, 2011).

4.5 Analisis Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisa kuantitatif *One Way* ANOVA. Uji *One Way* ANOVA, analisis statistik menggunakan $\alpha = 0,05$. Uji *One Way* ANOVA dimaksudkan untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak propolis sebagai preventif pada kultur makrofag yang diinfeksi virus ND, kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk melihat perbedaan tiap perlakuan.



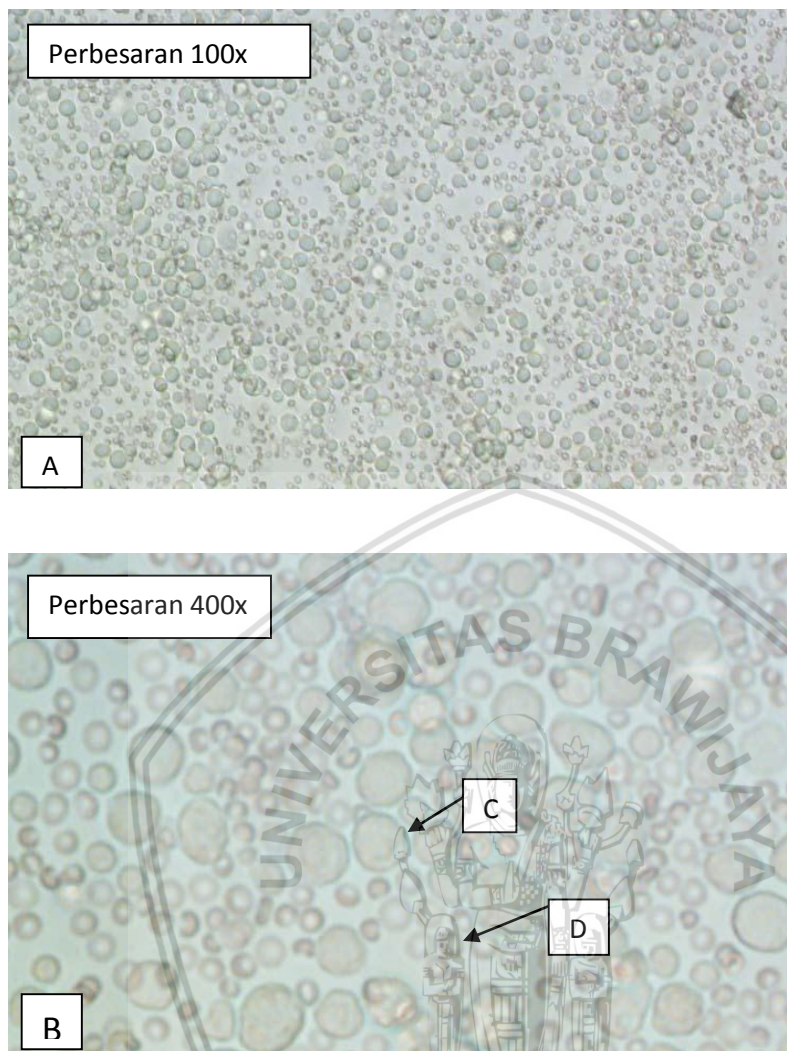
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekstrak Propolis Sebagai Preventif Infeksi Virus ND (*Newcastle disease*)

Secara *In Vitro* Pada Kultur Makrofag Berdasarkan Penurunan *Interferon alpha* (IFN- α) dan *Interleukin-17* (IL-17)

Sebelum penelitian berlangsung, dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk mengetahui berapa jumlah sel makrofag yang dihasilkan dari satu ekor mencit. setiap sumuran dalam kultur berisi 500.000 sel makrofag. Setelah dilakukan optimasi, dari satu ekor mencit mampu menghasilkan 2.500.000 sel. Penelitian ini memerlukan sebanyak 20 sumuran, sehingga jumlah mencit yang dibutuhkan hanya 4 ekor. Makrofag diisolasi dari peritoneum mencit dengan menginjeksikan medium RPMI 1640 kedalam rongga peritoneum mencit. RPMI 1640 merupakan larutan yang digunakan untuk menumbuhkan sel mamalia, terutama sel suspensi. Selanjutnya makrofag dikultur dalam medium lengkap (RPMI 1640, penicillin-streptomycin) dalam microplate 24 sumuran dasar rata. Fungsi penicillin-streptomycin dalam medium kultur adalah untuk membantu mencegah kontaminasi dari mikroorganisme lain.

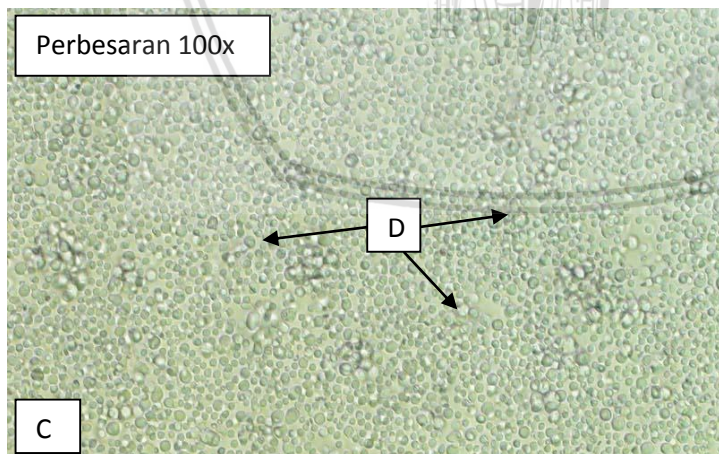
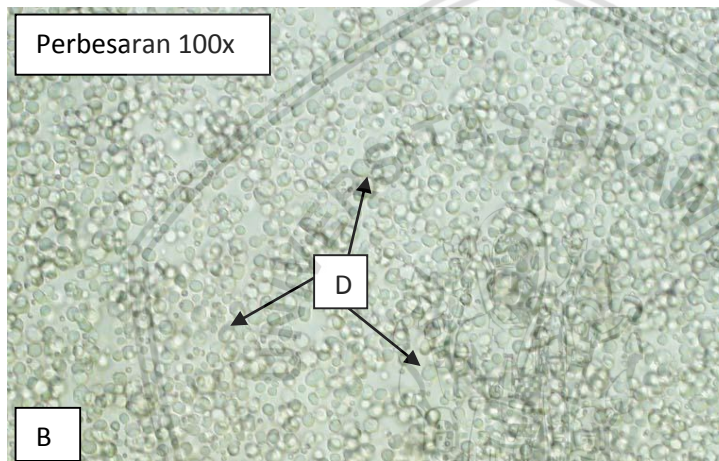
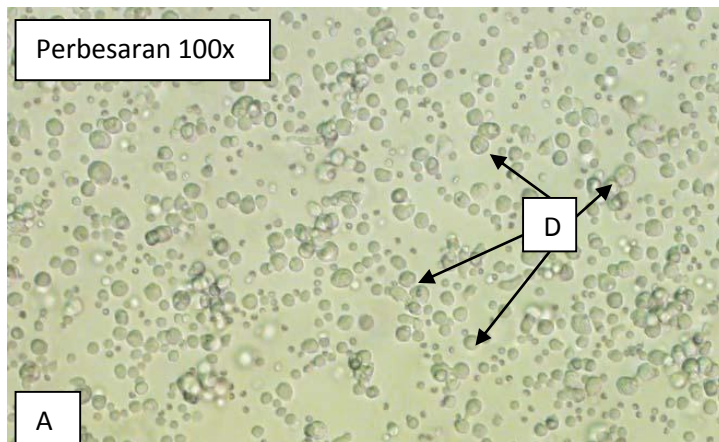
Berikut ini merupakan gambar makrofag yang diambil setelah dilakukan proses kultur:



Gambar 5.1 Gambaran kultur makrofag

keterangan : Gambaran kultur makrofag yang tidak diberi ekstrak propolis, **A** : pembesaran 100x, **B** : Pembesaran 400x, **C** : Sel makrofag, **D** : Eritrosit

Makrofag berukuran 10-30 mm, berbentuk bulan, permukaan mengkilat, kompak serta besarnya sama. Makrofag merupakan sel yang dapat bertahan berbulan-bulan bila berada didalam jaringan (Effendi, 2003) setelah diinkubasi selama 24 jam, makrofag diberi ekstrak propolis dengan beberapa tingkat konsentrasi yang berbeda-beda.



Gambar 5.2 Gambar kultur makrofag setelah diberi ekstrak propolis kemudian diinkubasi selama 24 jam (perbesaran 100x).

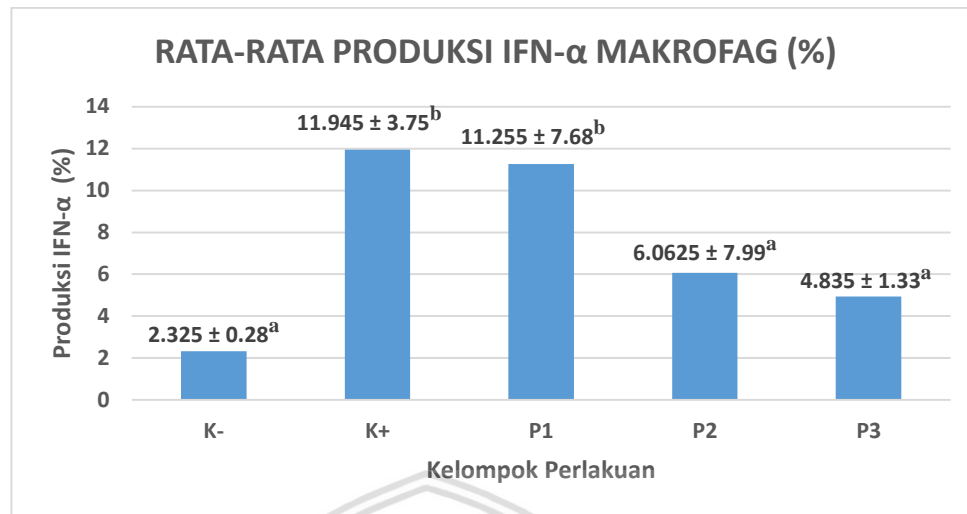
keterangan : **A** : ekstrak propolis 25 µg/ml, **B** : ekstrak propolis 50µg/ml, **C** : ekstrak propolis 100 µg/ml, **D** : makrofag. terjadi peningkatan proliferasi dari makrofag pada kultur makrofag yang diberi ekstrak propolis. Sehingga jumlah makrofag pada kultur yang diberi ekstrak propolis akan meningkat.

Pada perlakuan 1 (kultur makrofag yang diberi ekstrak propolis 25µg/ml) terlihat sel-sel makrofag berbentuk bulat besar, bergerombol, terlihat lebih padat dan lebih banyak dari kontrol negatif (**Gambar A**). Pada perlakuan 2 (kultur makrofag yang diberi ekstrak propolis 50µg/ml) terlihat sel-sel makrofag berbentuk bulat besar, bergerombol, terlihat lebih padat dan lebih banyak dari P1 (**Gambar B**). Pada perlakuan 3 (kultur makrofag yang diberi ekstrak propolis 100µg/ml) terlihat sel-sel makrofag berbentuk bulat besar, bergerombol, terlihat lebih padat dan lebih padat dari P2 (**Gambar C**). Penambahan propolis pada kultur makrofag mampu meningkatkan proliferasi makrofag. Dalam hal ini propolis telah terbukti berfungsi sebagai imunostimulator. Hal ini sesuai dengan pernyataan Gu (2005) bahwa pemberian propolis mampu meningkatkan jumlah sel makrofag pada proses kultur makrofag secara *in vitro*. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Wijayanti (2005), bahwa penambahan bahan yang bersifat imunostimulator akan meningkatkan respon pada makrofag dan menyebabkan pembelahan sel sehingga terjadi proliferasi dan makrofag mengalami peningkatan metabolik, motilitas dan aktivitas fagositosis secara cepat dan lebih efisien dalam membunuh bakteri ataupun virus. Dimana pada saat proses fagositosis, makrofag akan membunuh, menghancurkan, dan mengeliminasi antigen dari tubuh.

5.2 Pengujian Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Kadar IFN- α dengan Uji One Way ANOVA

Interferon alpha dalam keadaan normal berperan sebagai anti-viral (moreland, 2004). Ketika terjadi infeksi virus, makrofag akan bekerja dan memacu produksi sitokin. seperti yang tampak pada kontrol positif, kadar dari IFN- α meningkat dengan signifikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak propolis yang mengandung zat aktif berupa flavonoid dan tanin memberikan efek antiinflamasi, antiviral dan antioksidan yang ditandai dengan adanya rata-rata penurunan persentase IFN- α pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan rata-rata pada perlakuan 1 dengan konsentrasi preventif 25 $\mu\text{g/ml}$, perlakuan 2 dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ dan perlakuan 3 dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ terjadi penurunan produksi IFN- α oleh sel makrofag. Namun, rata-rata penurunan produksi IFN- α pada (P3) lebih mendekati nilai persentase kontrol negatif.

Rata-rata kadar IFN- α kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.3 Histogram Rata-rata kadar IFN-α

Keterangan : K(-) tanpa perlakuan; K(+) tidak diberi ekstrak propolis tetapi diinduksi virus; P(1), P(2), P(3) diinduksi virus ND dan ekstrak propolis konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata produksi IFN-α tertinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol positif yaitu sebesar 11.945 ± 3.75 . Pada kontrol negatif produksi IFN-α sangat rendah dibanding kontrol positif yaitu 2.325 ± 0.28 . Sedangkan pada perlakuan 2 dan 3 (Kultur makrofag yang diberi ekstrak propolis) hasil produksi IFN-α tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif, antara lain yaitu P1 11.255 ± 7.68 ; P2 6.0625 ± 7.99 ; P3 4.835 ± 1.33 . Data-data yang telah didapat kemudian dilanjutkan dengan uji normalitas dan homogenitas. Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levine* didapatkan hasil data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) (Lampiran 11) sehingga dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*.

Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil bahwa ekstrak propolis menurunkan produksi IFN-α secara signifikan ($p < 0,05$) (Lampiran 11). Hasil uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan pada uji *Post Hoc Tukey*. Hasil uji *Tukey*

menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak propolis berbeda nyata ($p < 0,05$) antar perlakuan (Lampiran 11). Produksi IFN- α pada setiap perlakuan disajikan pada tabel 5.1. Rumus perhitungan presentase peningkatan dan penurunan produksi IFN- α dapat dilihat pada Lampiran 11.

Tabel 5.1 Aktifitas IFN- α

Kelompok	Rata-rata Aktivitas IFN- α (%)
	(Mean \pm SD)
Kontrol (K-)	2.325 \pm 0.28 ^a
Kontrol (K+)	11.945 \pm 3.75 ^b
Perlakuan 25 mL/ekor (P1)	11.255 \pm 7.68 ^b
Perlakuan 50 mL/ekor (P2)	6.062 \pm 7.99 ^{ab}
Perlakuan 100 mL/ekor (P3)	4.835 \pm 1.33 ^a

Keterangan : Notasi menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil analisis flowsitometri kultur makrofag pada 5 kelompok perlakuan menunjukkan terdapat produksi IFN- α pada kontrol negatif atau dalam keadaan normal tanpa diberikan perlakuan apapun, dalam kondisi sehat atau normal IFN- α mempunyai efek inhibitor terhadap pertumbuhan sel (*cell growth inhibitor*). Dimana dalam hal ini virus adalah sumber rangsangan utama produksi IFN- α . Interferon adalah keluarga dari protein-protein yang terjadi secara alami yang dibuat dan dikeluarkan oleh sel-sel sistem imun contohnya sel-sel darah putih, sel-sel pembunuh alami, fibroblast dan sel-sel epitelial. Pada perlakuan kontrol positif produksi IFN- α meningkat dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif atau dalam kata lain K- berbeda nyata dengan K+ ($p < 0,05$). Peningkatan produksi IFN- α menunjukkan bahwa

infeksi virus ND 64 HAU pada kultur makrofag mampu menimbulkan respon imun nonspesifik yang ditandai dengan adanya peningkatan sitokin IFN- α yang dihasilkan oleh makrofag untuk melawan virus ND. Hal ini dikarenakan K- tidak diberikan perlakuan sedangkan K+ diberi perlakuan yaitu induksi virus ND 64 HAU tanpa diberikan ekstrak propolis. Sehingga ketika virus masuk makrofag akan mengeluarkan produk-produk seperti sitokin untuk melawan virus ND. Salah satu sitokin yang dihasilkan yaitu IFN- α . IFN- α berfungsi menghambat replikasi virus dengan cara mengaktivasi seluler gen yang mengakibatkan rusaknya mRNA dan terhambatnya translasi protein. Respon aktivasi makrofag terdiri dari migrasi dan kemotaksis, fagositosis dan produksi reaktif nitrogen dan oksigen. Respon ini merupakan reaksi peradangan dan membatasi penyebaran patogen (Qureshi,2000). Sehingga kadar IFN- α meningkat sejauh 80% dibandingkan (K-). IFN- α mengalami peningkatan dan penurunan terjadi pada setelah 2 jam diberikan induksi virus dengan melihat hasil tersebut melalui uji flowcytometry.

Pada perlakuan P1 jika dibandingkan dengan K- terlihat P1 mengalami penurunan 6% (K- berbeda nyata dengan P1) hal ini dikarenakan P1 hanya diberikan perlakuan yaitu induksi virus ND 64 HAU dan konsentrasi ekstrak propolis yang rendah yaitu sebanyak 25 $\mu\text{g/ml}$ sehingga notasi dari P1 turun 6%. Sedangkan pada perlakuan P2 dan P3 dengan induksi virus ND 64 HAU dan pemberian ekstrak propolis sebanyak 50 $\mu\text{g/ml}$ dan 100 $\mu\text{g/ml}$ terlihat mengalami penurunan yang signifikan yaitu sebesar 49% dan 59%, dalam kata lain (K- tidak berbeda nyata dengan P1 dan P2), Penurunan produksi IFN- α oleh makrofag diduga akibat virus ND telah mati. Ekstrak propolis mengandung senyawa antioksidan seperti *flavonoid*,

saponin, dan *polifenol*. *Flavonoid* mempunyai berbagai efek farmakologis antar lain sebagai imunostimulan, antikanker, antioksidan, antiviral, antialergi, dan antihepatotoksik. Imunostimulan bekerja dengan cara menstimulasi faktor utama sistem imun, antara lain melalui fagositosis, sistem komplemen, sekresi antibodi IgA, pelepasan IFN- α dan γ , limfosit T dan B, sintesis antibodi spesifik dan sitokin (Petrunov, Nenkov, and Shekerdjiisky, 2007). Mekanisme hambatan yang dilakukan oleh flavonoid sebagai antioksidan bisa terjadi secara langsung yaitu dengan mendorong ion hidrogen sehingga ion-ion yang mengalami radikal bebas berubah menjadi stabil. Keadaan ion yang telah stabil menyebabkan menurunnya keadaan stres oksidatif. Flavonoid juga akan mengurangi pelepasan dari perioksidase, yang menghambat produksi *reactive oxygen species* (Rachmadian, 2011). Sedangkan Sebagai antiviral, IFN- α dan β mempunyai 3 fungsi. Pertama adalah menghambat replikasi virus dengan cara mengaktifasi seluler gen yang mengakibatkan rusaknya mRNA dan terhambatnya translasi protein. Kedua mengaktifkan sel *natural killer* (NK) yang akan membunuh virus penginfeksi sel. Ketiga dengan menginduksi MHC (*mayor histocompatibility complex*) kelas 1 dan hadirnya antigen pada semua sel.

Selain itu, *caffeic acid phenetyl ester* (CAPE) yang memiliki aktivitas dalam hal meningkatkan respon imun juga terkandung di dalamnya (Herawati, 2015). Menurut penelitian Herawati (2015) menunjukkan bahwa ekstrak propolis dapat meningkatkan kemampuan fagositosis dari makrofag. Dapat disimpulkan bahwa perlakuan (P1) dengan konsentrasi ekstrak propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ belum mampu menurunkan kadar IFN- α mendekati kultur makrofag kondisi normal. Sedangkan

perlakuan (P3) dengan ekstrak propolis dengan konsentrasi 100 µg/ml lebih efektif menurunkan kadar IFN-α (**Gambar 5.2**).

5.3 Pengujian Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Kadar IL-17 dengan Uji

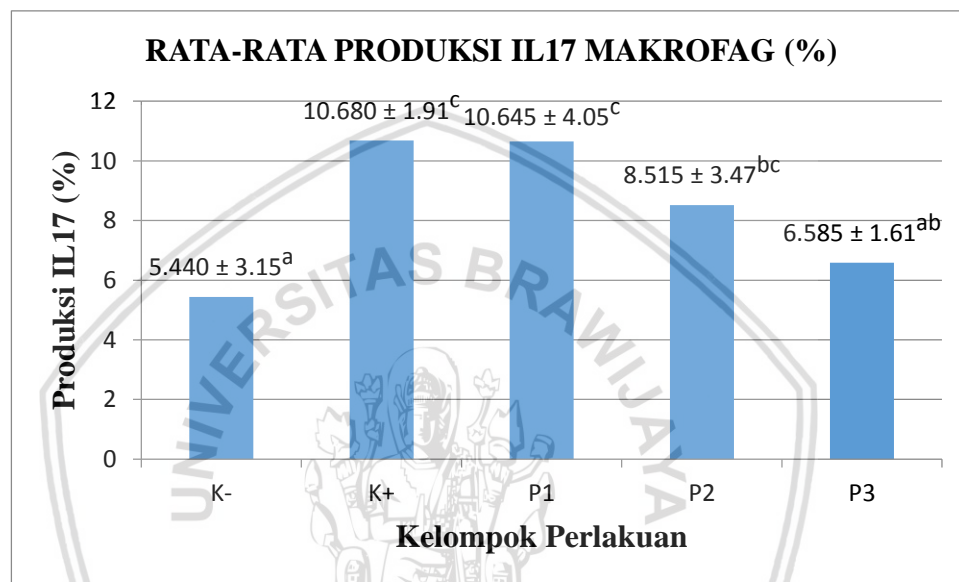
One Way ANOVA

Makrofag memiliki kemampuan menghasilkan sekresi sel yang dikenal dengan interleukin seperti TNF-α, IL-1, IL-4 dan IL-17. Sitokin dihasilkan oleh sel dalam reaksi radang atau imunologik yang berfungsi sebagai isyarat antara sel-sel untuk berkomunikasi dalam respon imun. Sitokin proinflamasi IL-17 merupakan salah satu interleukin yang memegang peranan sangat penting pada reaksi inflamasi dan sebagai sitokin proinflamasi yang merespon invasi sistem kekebalan tubuh oleh patogen intraseluler dan menginduksi kerusakan matriks seluler patogen (Chiricozzi A, 2010).

Semakin meningkat aktivitas patogen akan menyebabkan adanya infiltrasi sel yang mengakibatkan IL-17 juga meningkat seperti yang terdapat kontrol positif. Peningkatan kadar IL-17 berkorelasi dengan kerusakan sel dan inflamasi. Makrofag berperan sebagai salah satu sel dalam sistem pertahanan tubuh melawan invasi virus dengan cara fagositosis. sitokin IL-17 ini dapat memediasi makrofag mensintesis reaksi inflamasi untuk melindungi terhadap virus. Menurut pendapat Silva *et al* (2007), sitokin merupakan sinyal penting yang dihasilkan oleh sel-sel tubuh untuk mengaktifkan kerja sel lain, sehingga jenis dari sitokin yang disekresikan oleh sel akan memberikan efek pada sel target. Sitokin dapat bereaksi secara *autocrine* yaitu mempengaruhi lingkungan pada sel yang melepaskannya, *paracrine* berpengaruh

pada sel lain di sekitarnya dan *endocrine* yaitu berpengaruh terhadap lingkungan sel sekitarnya.

Rata-rata kadar IL-17 kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.4 Histogram Rata-rata kadar IL-17

keterangan : K(-) tanpa perlakuan; K(+) tidak diberi ekstrak propolis tetapi diinduksi virus; P(1), P(2), P(3) diinduksi virus ND dan ekstrak propolis konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml.

Hasil analisis flowsitometri kultur makrofag pada 5 kelompok perlakuan menunjukkan produksi IL-17 meningkat pada kelompok perlakuan kontrol positif dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif, peningkatan terjadi setelah 2 jam diinduksi virus ND (**Gambar 5.2**). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata produksi IL-17 tertinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol positif yaitu sebesar 10.680 ± 1.91 . Pada kontrol negatif produksi IL-17 sangat rendah dibanding kontrol positif yaitu 5.440 ± 3.15 . Sedangkan pada perlakuan 2 dan 3 (Kultur makrofag yang

diberi ekstrak propolis) hasil produksi IL-17 tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif, antara lain yaitu P1 10.645 ± 4.05 ; P2 8.515 ± 3.47 ; P3 6.585 ± 1.61 . Data-data yang telah didapat kemudian dilanjutkan dengan uji normalitas dan homogenitas. Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levine* didapatkan hasil data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) (Lampiran 13) sehingga dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*.

Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil bahwa ekstrak propolis menurunkan produksi IL-17 secara signifikan ($p < 0,05$) (Lampiran 13). Hasil uji *one way ANOVA* kemudian dilanjutkan pada uji *Post Hoc Tukey*. Hasil uji *Tukey* menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak propolis berbeda nyata ($p < 0,05$) antar perlakuan (Lampiran 13). Produksi IL-17 pada setiap perlakuan disajikan pada tabel 5.1. Rumus perhitungan presentase peningkatan dan penurunan produksi IL-17 dapat dilihat pada Lampiran 13.

Secara statistik diperoleh hasil bahwa pada kelompok perlakuan kontrol negatif atau dalam keadaan normal (tanpa perlakuan) menunjukkan terdapat produksi IL-17, namun peningkatan yang terjadi lebih sedikit dibandingkan dengan peningkatan akibat infeksi virus. Dalam keadaan sehat maupun sakit dibawah naungan sistem imun, IL-17 tetap diproduksi untuk menjaga homeostatis jaringan seperti jaringan hematopoeietik, otak, ginjal, paru dan kulit. Pada perlakuan K- jika dibandingkan dengan kontrol positif (K- berbeda nyata terhadap K+) yaitu terdapat peningkatan jumlah kadar IL-17 sebesar 49% hal ini dikarenakan pada perlakuan K+ diinduksi virus ND 64 HAU, induksi virus ND merangsang makrofag dan mengakibatkan adanya reaksi inflamasi sehingga makrofag akan memproduksi IL-17 sebagai respon

reaksi inflamasi untuk melindungi terhadap virus. Pada perlakuan P(1) dengan konsentrasi ekstrak propolis 25 µg/ml memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif ($<0,05$) (lampiran 12) yang ditandai dengan penurunan kadar IL-17 sebesar 0,3% (K- berbeda nyata dengan P1). Sedangkan pada perlakuan P2 dan P3 yaitu dengan konsentrasi 50 dan 100 µg/ml tampak signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif dengan penurunan kadar IL-17 sebesar 20% dan 38% (K- tidak berbeda nyata dengan P1 dan P2). Hal ini sesuai dengan pendapat Sivasubramaniam dan Seshadri (2005) bahwa ekstrak propolis memiliki kandungan zat aktif berupa flavonoid, tanin dan saponin yang berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan.

Flavonoid sebagai antioksidan melindungi tubuh terhadap efek radikal bebas dengan cara mentransfer sebuah elektron ke senyawa radikal bebas sehingga menjadi stabil dan sel terlindungi dari adanya peroksidasi lipid. Fungsi polifenol sebagai antiinflamasi bekerja dengan cara menghambat pelepasan mediator inflamasi sebagai antioksidan, sedangkan tanin memiliki kemampuan dalam menghentikan reaksi rantai radikal bebas secara efisien (Pazil, 2009). Mekanisme antiinflamasi saponin yaitu dengan mencegah kerusakan biomolekul akibat radikal bebas karena saponin mengandung gugus antioksidan. Hal ini memungkinkan saponin untuk merusak superoksida melalui pembentukan intermediate hidroperoksida (Fitriyani *et al*, 2011).

Tabel 5.2 Aktivitas IL-17

Kelompok	Rata-rata Aktivitas IL-17 (%)
	(Mean \pm SD)
Kontrol (K-)	5.440 \pm 3.15 ^a
Kontrol (K+)	10.680 \pm 1.91 ^c
Perlakuan 25 mL/ekor (P1)	10.645 \pm 4.05 ^c
Perlakuan 50 mL/ekor (P2)	8.515 \pm 3.47 ^{bc}
Perlakuan 100 mL/ekor (P3)	6.585 \pm 1.61 ^{ab}

Keterangan : Notasi menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok Perlakuan.

Pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif (K-) dengan perlakuan, terlihat bahwa penurunan kadar IL-17 ditunjukkan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak propolis konsentrasi 100 μ g/ml (P3). Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata kelompok perlakuan P3 lebih mendekati K- dibandingkan dengan perlakuan kontrol yang lain. Sehingga dapat ditunjukkan bahwa pemberian ekstrak propolis konsentrasi 100 μ g/ml (P3) mampu menurunkan kadar IL-17 hingga mendekati kultur makrofag normal (K-). Hal ini menunjukkan ekstrak propolis mampu berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antivirus tambahan dari luar yang berfungsi untuk menyeimbangkan sel yang mengalami radikal bebas sehingga menjadi stabil dan ROS dihasilkan lebih sedikit. Sedangkan pada kelompok pemberian ekstrak propolis dengan konsentrasi 25 μ g/ml berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif tapi memiliki notasi sama dengan kontrol positif. Hal ini membuktikan bahwa

pemberian ekstrak propolis dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ (P1) belum mampu menurunkan kadar IL-17 mendekati kultur makrofag dalam kondisi normal.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah ekstrak propolis yang digunakan sebagai preventif pada kultur makrofag yang diinfeksi virus *Newcastle disease*. Konsentrasi ekstrak propolis 100 µg/ml merupakan perlakuan terbaik yang memiliki efek paling besar untuk menurunkan produksi kadar *Interferon alpha* (IFN-α) dan *Interleukin 17* (IL-17).

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai variasi konsentrasi ekstrak propolis dan perlu adanya penelitian lebih untuk mengetahui efek klinis pada ayam sebagai preventif penyakit *Newcastle Disease*.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Garib, S. O., A. L. J. Gielkens, E. Gruys and G. Koch, 2003. *Review of Newcastle disease virus with particular reference to immunity and vaccination*. World's Poult. Sci. J. 59: 185-200.
- Aldous, E.W. & Alexander, D.J. 2001. *Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxoviruses type 1)*. Avian Pathology 30, 117 – 128.
- Aldous, E.W., J.K. Myn, J. Bank And D.J. Alexander. 2003. *A Molecular Epidemiological Study Of Avian Paramyxovirus Tipe 1 (Newcastle Disease Virus) Isolates By Phylogenetic Analysis Of A Partial Nucleotide Sequence Of The Fusion Protein Gene*. Avianpathol. 32: 239 – 256.
- Alexander, D.J. 2003. *New Castle Disease*. In: *Disease Of Poultry* 11th Ed. Saif, Y.M. (Ed.). Iowa State University Press. Ames. Pp. 64 – 87.
- BOUZARI, M. and P. SPARDBROW. 2006. *Early events following oral administration of Newcastle disease virus strain V4*. J. Poult. Sci. 43: 408 – 414.
- Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F., Ialenti, A. 2002. *Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract*. Fitoterapia 73(1):53–63.
- Cadenas, E., Packer, L. 2002 (c). *Expanded Caffeic Acid and Related Antioxidant Compound: Biochemical and Cellular Effects*. Handbook of Antioxidants. Second edition. California : Marcel Dekker, Inc. p. 279-303.
- Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nograles KE, Tian S, et al. (2011) *Integrative Responses to IL-17 and TNF-alpha in Human Keratinocytes Account for Key Inflammatory Pathogenic Circuits in Psoriasis*. J Invest Dermatol 131: 677–87.
- DEPTAN] Departemen Pertanian RI. 2006. *Restrukturisasi Sistem Perunggasan di Indonesia* [internet]. [diunduh pada 2013 Juni 20]. Tersedia: <http://www.ditjennak.go.id>.
- Efendi, Zukesti. 2003. *Daya Fagositosis Makrofag pada Jaringan Longgar Tubuh*. Bagian histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. E-Journal USU Library.

- Ensiklopedi Indonesia. 2003. *Serangga. Ensiklopedia Indonesia Seri Fauna*. Edisi kelima. Jakarta. PT. Ichtiar Baru Van Hoeve.
- Ferdous F, Maurice D, Scott T. 2008. *Broiler chick thrombocyte response to lipopolysaccharide*. Poult Sci. 87:61-63.
- FERREIRA, L., E. VILLAR and I. MUNOZ-BARROSO. 2004. *Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus reseptors*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36: 2344 – 2356.
- Gilman A, Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE. (2001). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill. ISBN 0-07-135469-7.
- Gómez, C.A.M., Gómez, R.M., Arráez, R.D., Segura, C.A., Fernández, G.A. 2006. *Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees*. J Pharmac Bio Anal 41:1220–34.
- Gu, Yeun-hwa. 2005. *Antioxidant activity and anti-tumorimmunity by Agaricus, propolis and paffia in mice*. Suzuka: University of Medical Science.
- Harmita dan Maksum, R. 2008. *Buku Ajar Analisis Hayati*. Edisi Ketiga. Jakarta: ECG pp: 63-67.
- Herawati, I., Husin, U. A., Sudigdo adi, S. 2015. *Pengaruh Ekstrak Etanol Propolis Terhadap Aktivitas & Kapasitas Fagositosis Pada Kultur Makrofag Yang Diinfeksi Enterophatogenic Escherichia Coli (EPEC)*. MKB Vol. 47 No. 2. Bandung : FK UNPAD.
- Janeway, C.A. and Travers, P.,1994, *Immuno Biology, the Immune System in Health and Disease*, Blackwell Scientifc Publ., Oxford, 9:11-9:12
- Jaya, F., Radiati, L. E., Awwaly, K. U., Kalsum, U. 2008. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Sistem Kekebalan Seluler Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Strain Wistar*. Malang : Universitas Brawijaya.
- Kencana, G.A.Y. & Kardena, I.M. 2011. *Gross pathological observation of acute Newcastle Disease in domestic chicken*. Disampaikan pada Seminar Internasioanal Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI) dan International Union of Microbiological Societies (IUMS) di Denpasar, 22-24 Juni 2011.

- Konsek and Kontsekova. 2007. *Forty Years of Interferon*. Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic.
- Kuby, Janis; Kindt, Thomas J.; Goldsby, Richard A.; Osborne, Barbara A. .2007. *Imunologi Kuby*. San Francisco: WH Freeman.
- Kusriningrum, R. S. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Krell, R. 1996. Propolis. *Value Added Products From Beekeeping*. FAO Agricultural Service Bulletin. Food and Agricultural Organization of The United Nation, number 124. P. 157-194.
- Mangkoewidjojo, S. 2006. *Hewan Laboratorium Dalam Penelitian Biomedik*. Jakarta: UI Press.
- Marcucci, M.C, Ferreres,F., Viguera ,G. C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas ,A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N. 2001. *Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities*. *J Ethnopharmacol* 74:105–12.
- Mims, C.A. and White, D.O, 1984, *Viral pathogenesis and immunology*, Blackwell Scientifc Publ.,Oxford, 108-109,169-170,172,174-175.
- Moreland L.W. 2004. *Rheumatology and immunology therapy: A to Z essentials*. Springer. ISBN 978-3-540-20625-5.Page.473-476.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima.S., Hara, H. 2009. *Comparison of Bee Products Based on Assays of Antioxidant Capacities*. Nagaragawa Research Center. Department of Biofunctional Evaluation, Molecular Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahorahigashi, Gifu 502-8585. Japan. Published online by Journal BioMed Central Medicine, 1472- 6882/9:4.
- OIE. 2010. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010*. www.oie.int. Akses tanggal 11 Mei 2011.
- OIE. 2012. *OIE Terrestrial Manual*. Newcastle Disease Chapter 2.3.14 page 1- 19.
- Pudjiatmoko, Syibli, M. 2014. *Manual Penyakit Unggas*. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta.

- Rahayuningsih, 2010. *Pengaruh Pemberian The Rosela (Hibiscus Sabdariff Linn) Terhadap Fungsi Makrofag Mencit*. Semarang : Universitas Diponogoro.
- Richard H. 2009. *INTERFERON*. The Board of Trustees of the University of South Carolina.
- Rifa'i, Muhaimin. 2011. *Alergi Dan Hipersensitivitas*. Diktat. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.
- Rue CA, Susta L, Cornax I, Brown CC, Kapczynski DR, Suarez DL, King DJ, Miller PJ, Afonso CL. 2011. *Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens*. J Gen Virol. 92:931-939.
- Sabir, A. 2009. Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis Trigona sp terhadap Bakteri *Streptococcus Mutans* (In vitro). Bagian Konservasi Gigi. Makasar. Fakultas Kedokteran universitas Hasanudin. Available from: <http://www.journal.unair.ac.id>. Vol: 38,no:3, 2005. Accessed at November 23,2010.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Dejour. 2005. *Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis*. Department of Botany. Brazil: Institute of Biosciences University of São Paulo Brazil. Published by Oxford University Press.
- Saif, Y.M., 2003. *Disease of Poultry*. 11th ed. Iowa State University Press, USA.
- Schuppan D. (2003). Treatment of Liver Fibrosis: From Bench to Bedside. Gut. May; 52(5): e1–e31.
- Scott T, Owens MD. 2008. *Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4 and MAP kinase and NF- κ B pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2*. Mol Immunol. 45:1001-1008.
- Sihombing, D.T.H. 2005. *Ilmu Ternak Lebah Madu*. Cetakan kedua. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R .2002. *"Cutting edge: IL-17D, anggota baru dari IL-17 keluarga, merangsang produksi sitokin dan menghambat hemopoiesis"* . Journal of Immunology 169 (2): 642-6

- Susilo, B. 2007. *Aktivitas Antimikroba Propolis dari malang Jawa Timur terhadap Staphylococcus aureus*. Majalah Kedokteran Tropis Indonesia. 18 (1):72- 77.
- Tabbu, C.R. 2000. *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya: Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral*. Kanisius, Yogyakarta.
- Thruseva, B., Trunkova, D., and Bankova, V. 2007. *Different Extraction Methods of Biologically Active Components from Propolis: a Preliminary Study*. Chemistry Central Journal. 1 (13): 1-4.
- Ugar, A. and T. Arslan. 2004. *An in vitro study on microbial activity of propolis from Mugla Province in Turkey*. Journal of Medicinal Foods 7 (1): 90-94.
- Viuda,M.V., Ruiz,N.Y., Fernández,L. J., Pérez,Á. J. 2008. *Functional Properties ofHoney, Propolis, and Royal Jelly*. Journal of Food Science, 73: R117–R124. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.
- Wade, C.R., 2005. Can Bee Propolis The Immune System. www. then aturals hopper.com/buy-beesupplements/article.htm.
- Ward DL, and Bing-You RG. (2001). *Autoimmune thyroid dysfunction induced by interferon-alpha treatment for chronic hepatitis C: screening and monitoring recommendations*. Endocr. Pract. Jan-Feb;7(1):52-8.
- West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, ErdjumentBromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS & Ghosh S. 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. Nature 472: 476–480.
- Wijayanti, L. 2005. *Aktivitas proliferasi limfosit setelah imunisasi intranasal protein terlarut Toxoplasma selama infeksi Toxoplasma gondii*. Bio SMART7 (1): 9-13